



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

**Organización transcripcional del
gen *rnr* en *Escherichia coli* enteropatógena**

Para obtener el grado de:
Licenciada en Biomedicina

Presenta:
Sixta del Carmen Ammi Moreno Carrasco

Directora:
M.C. Cristina Lara Ochoa

Abril, 2024

***“No son los grandes hombres que transforman el mundo, sino los débiles y
pequeños en las manos de un Dios grande”***

Hudson Taylor

Agradecimientos

En primer lugar le agradezco a Dios por la vida de mis padres, todos los días le doy gracias por bendecirme con los mejores padres que cualquier hijo podría desear. Gracias por todas y cada una de las infinitas bendiciones que ha derramado sobre mi vida y la vida de las personas que amo, por mostrarme su misericordia y su gracia; Dios sin su ayuda no podría haber logrado este trabajo, nunca me he apoyado en mi propio entendimiento porque sé que sin usted no estuviera en el lugar en donde me encuentro y no lograría ninguna meta.

Dios usted conoce los deseos que hay en mi corazón, no puedo ocultar nada delante de su presencia, le pido que me de fortaleza y sabiduría para poder lograr mis objetivos, mi confianza en el futuro está en Dios que controla mi vida.

Me gustaría expresar agradecimiento especial a mis padres María Gloria y Carlos, gracias por permitirme conocer a Dios y de su infinito amor desde mi niñez. María Gloria hermosa, preciosa para mí usted es una mujer virtuosa, es una buena hija, una mujer trabajadora, una esposa extraordinaria, una excelente madre y una mujer sabia; la amo con mi alma y doy gracias a Dios por la bendición de que usted sea mi madre.

Padre le agradezco por ser un excelente padre, gracias por mostrar su amor a través de las correcciones realizadas a mi hermano y a mí, por ser un padre trabajador y proveedor, por la educación que junto a mi madre nos han inculcado, por enseñarnos a ser personas de bien y humildes, por anhelar un mejor futuro para mi hermano y para mí.

Madre y padre muchas gracias por instruirme en que la vida no es sencilla pero que todo se puede lograr confiando en Dios y trabajando arduamente, por prepararme para hacerle frente a las dificultades de esta vida, siempre me han enseñado a ser perseverante, a dar lo mejor de mí, a poner todo el amor y el esfuerzo a cualquier trabajo a realizar, a dar más que un 100%, dar lo máximo aun cuando el cuerpo y la mente digan lo contrario. Gracias por su apoyo incondicional y ser ese combustible que me impulsa a direccionar mi vida hacia un mejor mañana, los amo. Este triunfo no lo habría alcanzado sin su ayuda, este logro conseguido es fruto también de ustedes.

Irving, hermano te admiro por ser un hombre fuerte a pesar de las dificultades que has experimentado, te amo hermano y me siento orgullosa de tener un buen hermano. Gracias por tu apoyo y cariño, por enseñarme que siempre se puede sonreír aun en los días más complicados.

A mis sobrinos, Carlos Dilan y Guillermo Ian por el amor y las manifestaciones de afecto hacia mi persona son una enorme bendición de Dios en mi vida.

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mis tíos Dina y Manuel que sin obligación siempre me han apoyado, gracias por tener un enorme corazón y hacerme sentir como su hija, muchísimas gracias por el intenso deseo de mí bien hasta donde me sea posible.

Gracias a mis primos, Diana, Ivan y José Manuel por sus ocurrencias, bromas y de más que me sacan una que otra sonrisa. Los quiero.

Estoy particularmente agradecida con mi asesora la M.C. Cristina Lara Ochoa por aceptarme como su alumna y brindarme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, por todo su tiempo, confianza y optimismo para el desarrollo de este. Gracias por su empatía frente a las dificultades en tiempos de pandemia. Le agradezco por su dedicación, paciencia y asesorías, por la disciplina con la que documenta los experimentos; los tendré grabados en la memoria de mi formación profesional, me siento afortunada de haber realizado mi tesis con usted.

Maestra Cristina, gracias por crear una convivencia más amena en el laboratorio y abrir las puertas de su casa, muchas gracias por su hospitalidad. Siga ejerciendo todo aquello lo que le apasiona. Mis mejores deseos y éxito en todo lo que realice. Dios la bendiga.

Gracias a mi comité revisor integrado por la D.C. Liliana López Pliego y la D.C. Claudia Fabiola Martínez de la Peña por sus observaciones, el tiempo invertido y las sugerencias para mejorar el escrito de la tesis.

Quiero agradecer a Ana Giovanna y Gabriela por su amistad durante estos 5 años de la licenciatura, me alegro de tener dos buenas amigas, les deseo todo el éxito en lo que les depare el futuro.

Gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio Rebeca, Gaby, Nitza, la señora Rosy, Rodrigo y Edwin; ha sido un placer conocerlos y convivir con ustedes.

Índice de contenido

Lista de abreviaturas	iii
Índice de figuras	vi
Índice de tablas	viii
Resumen	2
Introducción	4
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	6
Determinantes genéticos asociados a los fenotipos LA y A/E	7
Mecanismo de patogenicidad de EPEC.....	10
Antecedentes.....	14
Antecedentes generales.....	14
Antecedentes específicos	18
Justificación	24
Hipótesis.....	25
Objetivos.....	25
Objetivo general	25
Objetivos específicos	25
Materiales y métodos.....	26
Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento	26
Diseño de oligonucleótidos.....	26
Extracción de DNA genómico.....	28
PCR punto final	28
Electroforesis en gel de agarosa	29
Extracción de RNA	30
RT-PCR punto final	31

Análisis bioinformáticos	33
Análisis estadístico	33
Resultados.....	34
Análisis <i>in silico</i> de la región promotora de <i>rnr</i>	34
Organización genética de homólogos de <i>rnr</i> de la subfamilia SF1.....	36
Estandarización de las condiciones de amplificación de los genes <i>E2348C_2634</i> , <i>rnr</i> y <i>E2348C_2636</i>	39
Expresión de <i>rnr</i> bajo diferentes condiciones de crecimiento.....	41
Evaluación de la organización transcripcional de los genes <i>E2348C_2634</i> , <i>rnr</i> y <i>E2348C_2636</i>	43
Discusión	46
Conclusiones	53
Perspectivas	54
Bibliografía.....	55
Anexos.....	68

Lista de abreviaturas (traducción al español – significado en inglés)

- A/E** Adherencia y destrucción (Attaching and Effacing)
- AAF** Fimbria de adherencia agregativa (Aggregative Adherence Fimbriae)
- Aar** Regulador activado por AggR (AggR activated Regulator)
- ANR** Regulador negativo de la familia AraC (AraC family Negative Regulator)
- Arp2/3** Proteínas relacionadas con la actina 2/3 (Actin-related protein 2/3)
- BFP** Pilus formador de mechones (Bundle Forming Pilus)
- cDNA** Ácido desoxirribonucleico complementario (Complementary Deoxyribonucleic Acid)
- CF** Factores de colonización fimbrial (Fibrillar Colonization Factors)
- CFA** Antígeno del factor de colonización (Colonization Factor Antigen)
- c-Fyn** Cinasa del hospedero
- CS** Antígeno de superficie (Coli Surface Antigen)
- DAF** Factor acelerador de desintegración (Decay-Accelerating Factor)
- DEC** *E. coli* diarrogénicos (Diarrhoeagenic *E. coli*)
- DMEM** Medio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- DNA** Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
- dNTP's** Desoxirribonucleótidos trifosfatos (Deoxyribonucleotide triphosphates)
- ECP** Pilus común de *E. coli* (*E. coli* Common Pilus)
- Esc** (*E. coli* secretion)
- Eth** Etanolamina (Ethanolamine)
- eut** Operón de utilización de etanolamina (Ethanolamine utilization operon)
- ExPEC** *E. coli* extraintestinal (Extraintestinal *E. coli*)
- Fis** Factor para la estimulación de inversión (Factor for inversion stimulation)
- GadX** Glutamato decarboxilasa (Glutamate decarboxylase)
- GrIA** Regulador global de LEE-activador (Global regulator of LEE-activator)
- GrIR** Regulador global de LEE-represor (Global regulator of LEE-repressor)
- H-NS** Proteína estructural tipo histona (Histone-like Nucleoid-Structure protein)
- HTH** Hélice-giro-hélice (Helix-Turn-Helix)
- IHF** Factor de integración del huésped (Integration Host Factor)

kDa Kilo Daltones

LA Adherencia localizada (Localized Adherence)

LB Medio Luria-Bertani (Luria-Bertani)

LEE Locus de destrucción del enterocito (Locus of Enterocyte Effacement)

Ler Regulador codificado en LEE (LEE-encoded regulator)

LT Enterotoxina termolábil (heat-labile enterotoxin)

ml Mililitros

mM milimolar

Nck Región no catalítica de la proteína adaptadora tirosina quinasa (Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein)

Nle Efectores no codificados en LEE (Non LEE encoded Effectors)

N-WASP Proteína del síndrome neural Wiskott Aldrich (Neural-Wiskott-Aldrich Syndrome Protein)

ORF Marco de lectura abierto (Open Reading Frame)

pAA Plásmido de adherencia agregativa (Plasmid of Aggregative Adherence)

pb Pares de bases

PCR Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

pEAF Factor de adherencia de EPEC (EPEC Adherence Factor)

per Regulador codificado en el plásmido (Plasmid Encoded Regulator)

PerA Regulador A codificado en el plásmido (Plasmid Encoded Regulator A)

QseA Regulador A de Quorum-sensing de *E. coli* (Quorum-sensing *E. coli* regulator A)

RNA Ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid)

RNAP RNA polimerasa

Rnr Regulador negativo de RegA (RegA negative regulator)

rpm Revoluciones por minuto

RT-PCR Transcripción Reversa-Reacción en cadena de la polimerasa (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

SDS Dodecilsulfato Sódico (Sodium Dodecyl Sulfate)

Sep Proteínas secretadas de *E. coli* (Secretion of *E. coli* proteins)

SSTIII Sistema de secreción tipo III

ST Enterotoxina termoestable (Heat-stable enterotoxins)

Stx Toxina Shiga (Shiga toxin)

TA Temperatura ambiente

TAE Tris-acetato-EDTA (Tris-Acetate-EDTA)

Tir Receptor de intimina translocado (Translocated Intimin Receptor)

µl Microlitro (Microlitre)

µM Micromolar

°C Grados Celsius (Degrees Celsius)

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo de patogenicidad de patotipos diarrogénicos de <i>E. coli</i>	5
Figura 2. Determinantes genéticos asociados a los fenotipos LA y A/E en EPEC. 8	8
Figura 3. Representación esquemática del SSTIII de EPEC.....	9
Figura 4. Etapas del mecanismo de patogénesis de EPEC.	12
Figura 5. Esquema de la regulación de la expresión de los genes de virulencia de la isla LEE y el plásmido pEAF.....	17
Figura 6. Esquema de la estructura general de los miembros de la familia AraC/XylS.....	18
Figura 7. Esquema de la regulación de la expresión de los genes de virulencia en la cepa prototipo EAEC 042.	21
Figura 8. Esquema de la predicción de promotores de <i>E2348C_2634</i> , <i>rnr</i> y <i>E2348C_2636</i>	35
Figura 9. Organización genética de homólogos de <i>rnr</i> de la subfamilia SF1.....	38
Figura 10. Estandarización de las condiciones de amplificación de los genes <i>E2348C_2634</i> , <i>rnr</i> , <i>E2348C_2636</i> , <i>E2348C_2634-rnr</i> , <i>rnr-E2348C_2636</i> y <i>E2348C_2634-E2348C_2636</i>	40
Figura 11. Expresión de <i>rnr</i> bajo diferentes condiciones de crecimiento en EPEC WT.....	42
Figura 12. Expresión transcripcional de los genes <i>E2348C_2634</i> , <i>rnr</i> y <i>E2348C_2636</i> en DMEM.	44
Figura 13. Expresión transcripcional de los genes <i>E2348C_2634</i> , <i>rnr</i> y <i>E2348C_2636</i> en DMEM/NH ₄ ⁺	45
Figura 14. Modelo de la acción de Rnr en la regulación de los genes de virulencia en EPEC.....	52
Figura 15. Expresión de <i>rnr</i> bajo diferentes condiciones de crecimiento en EPEC WT (repetición).....	68

Figura 16. Expresión transcripcional de los genes <i>E2348C_2634</i> , <i>rnr</i> y <i>E2348C_2636</i> en DMEM (repetición).....	69
Figura 17. Expresión transcripcional de los genes <i>E2348C_2634</i> , <i>rnr</i> y <i>E2348C_2636</i> en DMEM/NH ⁴⁺ (repetición)	70
Figura 18. Alineamiento global por pares de las secuencias nucleotídicas de <i>E2348C_2634</i> (EPEC) y <i>ROD_RS01485</i> (<i>C. rodentium</i> ICC168) en la herramienta EMBOSS-Needle.	72
Figura 19. Alineamiento global por pares de las secuencias nucleotídicas de <i>E2348C_2636</i> (EPEC) y <i>ROD_RS25780</i> (<i>C. rodentium</i> ICC168) en la herramienta EMBOSS-Needle.	73
Figura 20. Alineamiento global por pares de las secuencias aminoacídicas de CAS10182.1 (EPEC) y WP_000206136.1 (<i>C. rodentium</i> ICC168) en la herramienta EMBOSS-Needle.	73
Figura 21. Alineamiento global por pares de las secuencias aminoacídicas de CAS10184.1 (EPEC) y WP_012904652.1 (<i>C. rodentium</i> ICC168) en la herramienta EMBOSS-Needle.	73

Índice de tablas

Tabla 1 Proteínas efectoras y función.....	13
Tabla 2 Cepa y oligonucleótidos usados en este estudio	26
Tabla 3 Oligonucleótidos diseñados en este estudio	27
Tabla 4 Componentes de la PCR punto final	29
Tabla 5 Condiciones de PCR punto final	29
Tabla 6 Reactivos para la eliminación de DNA residual utilizando el kit RapidOut DNA Removal.....	30
Tabla 7 Condiciones de reacción para remover el DNA genómico.....	31
Tabla 8 RT-PCR usando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis	31
Tabla 9 Condiciones de RT-PCR.....	32
Tabla 10 Componentes de la RT-PCR punto final	32
Tabla 11 Sitios putativos de unión de factores de transcripción localizados río arriba de <i>E2348C_2634</i>	35
Tabla 12 Promedio de densidad normalizada de <i>perA</i> y <i>rnr</i> en medio DMEM.....	71
Tabla 13 Promedio de densidad normalizada de <i>perA</i> y <i>rnr</i> en medio DMEM/NH ₄ ⁺	71
Tabla 14 Promedio de densidad normalizada de <i>perA</i> y <i>rnr</i> en medio LB	71

Resumen

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es uno de los principales agentes etiológicos de la diarrea infecciosa en niños que viven en países en vías de desarrollo. La infección causada por EPEC se caracteriza por la inducción de dos fenotipos sobre las células del intestino delgado: el fenotipo de adherencia localizada (LA) y el fenotipo de adherencia y destrucción (A/E). Los elementos genéticos responsables de los fenotipos LA y A/E están codificados en el plásmido pEAF (EPEC Adherence Factor) y en la isla LEE (Locus of Enterocyte Effacement), respectivamente.

La expresión de los genes de virulencia en este patotipo diarrogénico está bajo el control estricto de diversas proteínas reguladoras globales y específicas, entre estas últimas se encuentra la proteína PerA (Plasmid Encoded Regulator A) codificada por el operón *perABC* ubicado en el plásmido pEAF, PerA pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS; esta proteína activa al operón *perABC* (por lo tanto está sujeta a autorregulación) y al operón *bfp* en donde se codifican los genes para la biogénesis y la función del pilus BFP (Bundle Forming Pilus). La regulación de los genes de virulencia de la isla LEE por PerA es indirecta y la realiza a través de la proteína PerC la cual activa la expresión de *ler* que codifica a Ler (LEE-encoded regulator).

PerA es una de las muchas proteínas que participan en la red de regulación de los determinantes de virulencia de EPEC, a esta compleja red de regulación se une Rnr (RegA negative regulator) miembro de la familia ANR (AraC family Negative Regulator) el cual regula negativamente a PerA. El gen *rnr* que codifica para Rnr se localiza en el cromosoma de EPEC y está flanqueado río arriba por el gen *E2348C_2634* y río abajo por el gen *E2348C_2636* (las últimas 20 pb de *rnr* se empalman con *E2348C_2636*), estos genes se encuentran en la misma orientación que *rnr*; la organización y la orientación genética en la que se ubican estos tres genes probablemente estructuren a un operón.

El presente estudio, tiene como objetivo analizar la organización transcripcional del gen *rnr* en EPEC (E2348/69) serotipo O127:H6. Con esta finalidad, se hizo uso de RT-PCR punto final para evaluar la expresión de

E2348C_2634, *rnr* y *E2348C_2636* como unidades transcripcionales independientes y como operón en condiciones de crecimiento en DMEM (condición de inducción de genes de virulencia) y DMEM/NH₄⁺ (condición de represión de genes de virulencia) a 37°C. De acuerdo con los resultados obtenidos se identificaron dos productos de 874 pb y 400 pb que corresponden al tamaño de *E2348C_2634-rnr* y *rnr-E2348C_2636*, respectivamente; el producto de *E2348C_2634-rnr* fue identificado únicamente en medio DMEM/NH₄⁺, mientras que el segundo producto de *rnr-E2348C_2636* se expresa en DMEM como en DMEM/NH₄⁺. Los resultados indican que los genes *E2348C_2634-rnr* y *rnr-E2348C_2636* se estructuran como operones bicistrónicos y que la expresión de estos depende de las condiciones de crecimiento de EPEC.

Introducción

La diarrea es la deposición líquida de tres o más veces por día, representa la segunda causa de mortalidad en niños menores de cinco años en países en vías de desarrollo (World Health Organization [WHO], 2017). De acuerdo con registros del Fondo Internacional de Emergencia de las Naciones Unidas para la Infancia (United Nations International Children's Emergency Fund [UNICEF], 2021) cada año las enfermedades diarreicas provocan la muerte de 444,000 niños (UNICEF, 2021). La causa más frecuente de diarrea es la infección del tracto intestinal, los agentes etiológicos pueden ser bacterianos, virales y parasitarios, los cuales son adquiridos a través de alimentos y/o agua contaminados, contacto persona-persona y por vía zoonótica. Los principales agentes etiológicos causantes de la diarrea infecciosa son los Rotavirus y *Escherichia coli* (*E. coli*) (WHO, 2017).

E. coli es una bacteria gram negativa, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, bacilo flagelado, anaerobio facultativo, mesófilo, no esporulante; es una de las primeras bacterias que coloniza el intestino del neonato y la enterobacteria más abundante en la microbiota intestinal humana (Nataro y Kaper, 1998; Gomes *et al.*, 2016). *E. coli* es una bacteria comensal que reside en la capa mucosa del colon de los mamíferos, en donde coexiste sin causar daño alguno, pues tiene un importante papel en el mantenimiento de la fisiología intestinal, rara vez causa enfermedad en individuos sanos. Sin embargo, algunos patotipos poseen la capacidad de causar enfermedades intestinales y extraintestinales en personas sanas como en personas inmunodeprimidas. Esto sucede a través de la adquisición de determinantes genéticos de virulencia codificados en elementos genéticos móviles (plásmidos, bacteriófagos, transposones e islas de patogenicidad) que les confiere la adaptación a nuevos nichos y el potencial de causar una amplia variedad de enfermedades en seres humanos (Kaper *et al.*, 2004; Chen y Frankel, 2005).

La clasificación de los patotipos de *E. coli* comprende: patotipos extraintestinales (ExPEC) que incluye a *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* asociada a meningitis (MNEC), y patotipos diarrogénicos (DEC) o intestinales, a este grupo pertenecen *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica

(EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* difuso adherente (DAEC) (Figura 1) (Kaper *et al.*, 2004).

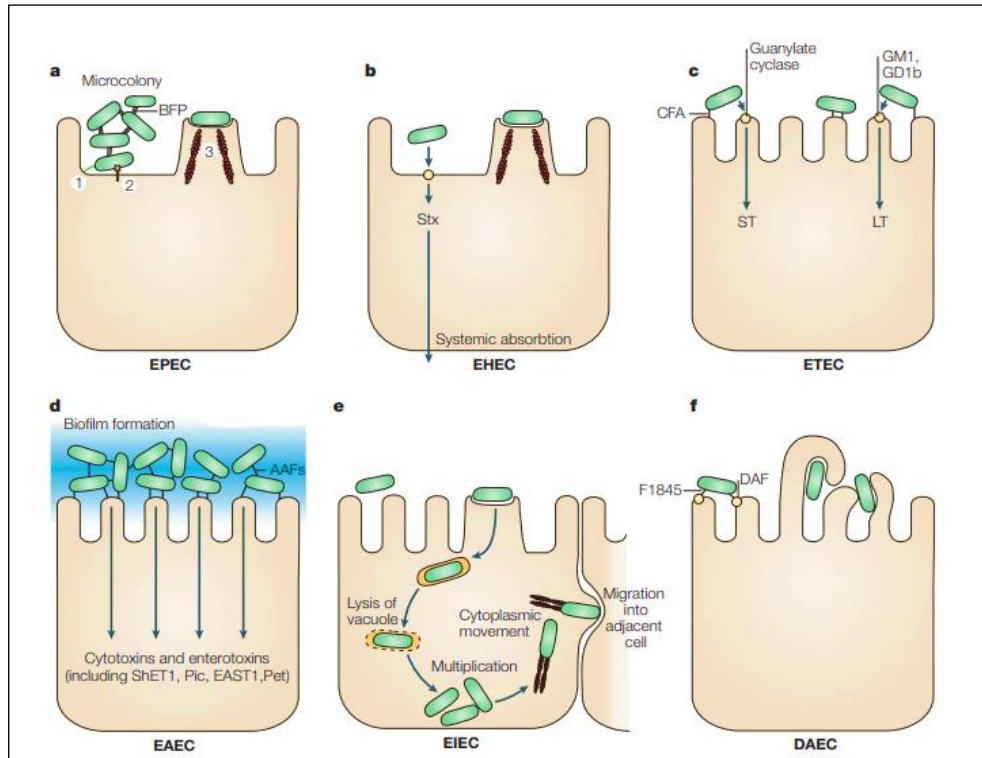


Figura 1. Mecanismo de patogenicidad de patotipos diarrogénicos de *E. coli*.

a) EPEC se adhiere a los enterocitos del intestino delgado causando la lesión A/E (Attaching and Effacing) en tres etapas: 1) adherencia inicial de la bacteria al epitelio intestinal del huésped a través del BFP (Bundle Forming Pilus), 2) transducción de señales mediante la translocación de proteínas efectoras a través del sistema de secreción tipo III (SSTIII) y 3) adherencia íntima por medio de la interacción de la proteína Intimina y su receptor Tir. **b)** EHEC coloniza el intestino grueso, donde produce la lesión A/E, EHEC secreta la toxina Shiga (Stx) causante de la colitis hemorrágica y del síndrome urémico hemolítico. **c)** ETEC coloniza el intestino delgado a través de uno o más factores de adherencia como la colonización fimbrial (CF), el antígeno del factor de colonización (CFA), el antígeno de superficie (CS) o el factor de colonización putativo (PCF); secreta toxinas termolábiles (LT) y termoestables (ST), estas toxinas alteran la regulación de los canales iónicos de la membrana epitelial, generando pérdida de iones y agua. **d)** EAEC, patotipo con capacidad de colonizar el intestino delgado y el intestino grueso, se adhiere a las células intestinales mediante la fimbria de adherencia agregativa (AAF), forma biopelículas “ladrillos apilados”, secreta enterotoxinas y citotoxinas. **e)** EIEC coloniza el colon, posteriormente lisa la vacuola endocítica lo que lleva a la multiplicación celular y, a la formación de colas de actina que le confiere movimiento en el interior de la célula y hacia las células adyacentes. **f)** DAEC coloniza el intestino delgado, a través de la adhesina F1845 y DAF (Decay-Accelerating Factor) provocando efectos sobre las vías de transducción de señales de los enterocitos, caracterizada por la inducción de proyecciones celulares largas que rodean a la bacteria. Imagen tomada de (Kaper *et al.*, 2004).

***E. coli* enteropatógena (EPEC)**

EPEC es uno de los principales agentes infecciosos de la diarrea en niños menores de dos años en países en vías de desarrollo (Pearson *et al.*, 2016), este patógeno extracelular causa enfermedad al adherirse a la superficie de las células del huésped e inyectar directamente, a través de su SSTIII, factores de virulencia (Lanata *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2016; Serapio-Palacios y Finlay, 2020; Mare *et al.*, 2021). La transmisión de EPEC se da mediante la vía oral-fecal a través de superficies y fluidos contaminados (Gomes *et al.*, 2016), la infección causa diarrea acuosa abundante, vómitos y fiebre; la diarrea inducida produce un incremento de la permeabilidad epitelial y alteraciones en la secreción de iones Cl^- y HCO_3^- (Vallance y Finlay, 2000).

Las cepas de EPEC se clasifican en EPEC típicas y EPEC atípicas en función de la presencia (típicas) o ausencia (atípicas) de un plásmido de virulencia llamado pEAF (EPEC Adherence Factor) que contiene a los genes que codifican para la fimbria BFP. Las cepas de EPEC típica se caracterizan por la inducción de dos fenotipos sobre las células del intestino delgado, el fenotipo de adherencia localizada (LA) y el fenotipo de adherencia y destrucción (A/E) (Vallance y Finlay, 2000). El fenotipo LA está mediado por la fimbria tipo IV conocida como BFP que contribuye a la antigenicidad, la autoagregación y la adhesión a células intestinales (Gomes *et al.*, 1989; Donnenberg y Kaper, 1992; Gomes *et al.*, 2016). La histopatología A/E es producida por la translocación de proteínas efectoras a través del SSTIII que tiene como resultado el rearreglo de las microvellosidades del epitelio intestinal y cambios en el citoesqueleto como la acumulación de actina polimerizada debajo del sitio de adherencia de la bacteria que lleva a la formación de estructuras en forma de pedestales, reducción en la absorción de la mucosa intestinal que conduce a la alteración del equilibrio electrolítico y posteriormente a la diarrea (Clarke *et al.*, 2003; Kaper *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2016).

Determinantes genéticos asociados a los fenotipos LA y A/E

Los fenotipos LA y A/E producidos por las cepas típicas de EPEC son resultado de dos elementos genéticos, el plásmido pEAF y la isla LEE respectivamente (Figura 2) (Bustamante *et al.*, 2001; Kaper *et al.*, 2004).

En el pEAF se ubica el operón *bfp* estructurado por 14 genes (*bfpA*, *bfpB*, *bfpC*, *bfpD*, *bfpE*, *bfpF*, *bfpG*, *bfpH*, *bfpI*, *bfpJ*, *bfpK*, *bfpL*, *bfpP*, *bfpU*) necesarios para la expresión de la fimbria BFP (Donnenberg y Kaper, 1992; Tobe *et al.*, 1996; Kaper *et al.*, 2004). *bfpA* codifica la subunidad estructural principal de BFP y su expresión óptima se produce durante el crecimiento exponencial a temperaturas de 35°C a 37°C y en presencia de calcio, los iones amonio disminuyen significativamente la expresión de *bfpA* y del fenotipo LA (Clarke *et al.*, 2003). En el mismo pEAF a 6.7 kb río abajo del operón *bfp* se localiza el operón *per* (Plasmid Encoded Regulator) integrado por los genes *perA*, *perB* y *perC* requeridos para la expresión completa de BFP (Figura 2A) (Clarke *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2016) y cuyos productos regulan al operón *bfp* y a los genes de la isla LEE (Kaper *et al.*, 2004).

La isla LEE comprende 41 marcos de lectura abiertos (ORFs) distribuidos en cinco operones policistrónicos (*LEE1-LEE5*), dos operones bicistrónicos (*espG-rorfl* y *grlR-grlA*) y cuatro unidades transcripcionales (*etgA*, *cesF*, *map* y *escD*) (Figura 2B). Esta isla se encuentra formada por los genes que codifican para los componentes esenciales del SSTIII, reguladores, chaperonas y proteínas efectoras (Elliott *et al.*, 1998; Kaper, Nataro y Mobley, 2004; Gomes *et al.*, 2016; Serapio-Palacios y Finlay, 2020). Los operones *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* contienen los genes *esc* (*E. coli* secretion) y *sep* (secretion of *E. coli* proteins) que codifican los componentes estructurales del SSTIII. En el operón *LEE1* también se encuentra el gen *ler* que codifica a Ler (LEE-encoded regulator), proteína reguladora que activa la transcripción del resto de los operones de la isla LEE. El operón *LEE4* codifica a las proteínas secretadas por el SSTIII (EspA, EspB, EspD y EspF). El operón *LEE5* codifica a la proteína de membrana externa de 94 kDa llamada Intimina y su receptor Tir (Translocated Intimin Receptor) que participan en la unión íntima de EPEC a las células intestinales (Kaper *et al.*, 2004; Mellies *et al.*, 2007; Pearson *et al.*, 2016;

Gomes *et al.*, 2016). Los genes *espG* y *rorf1* presentes en el operón bicistrónico *espG-rorf1* codifican para una proteína efectora y una proteína de función desconocida, respectivamente (Shaw *et al.*, 2005). Finalmente, el operón bicistrónico *grlR-grlA* codifica las proteínas GrlR (Global regulator of LEE-repressor) y GrlA (Global regulator of LEE-activator) que regulan negativa y positivamente la expresión de los genes de la isla LEE (Deng *et al.*, 2004).

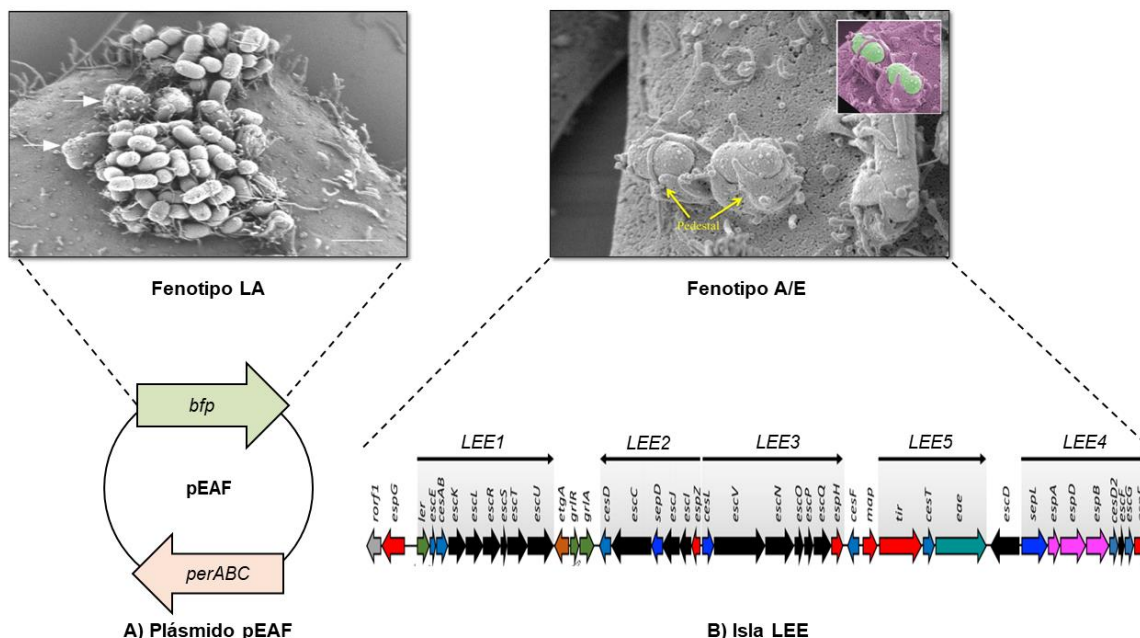


Figura 2. Determinantes genéticos asociados a los fenotipos LA y A/E en EPEC.

A) En el pEAF se ubica el operón *bfp* que codifica para la fimbria BFP, BFP participa en la antigenicidad, la autoagregación, la adhesión a células intestinales y la generación del fenotipo LA, en la parte superior de la figura se encuentra una microscopía electrónica de barrido del fenotipo LA caracterizado por la agregación de microcolonias bacterianas, imagen tomada de (Saldaña *et al.*, 2009); a 6.7 kb río abajo del operón *bfp* se sitúa el operón *per* el cual codifica para las proteínas PerA, PerB y PerC. PerA y PerC son reguladores del operón *bfp* y de la isla LEE. **B)** La isla LEE se localiza en el cromosoma, está organizada en cinco operones policistrónicos (*LEE1-LEE5*), dos operones bicistrónicos (*espG-rorf1* y *grlR-grlA*) y cuatro unidades transcripcionales (*etgA*, *cesF*, *map* y *escD*) que codifican el SSTIII, reguladores, chaperonas y proteínas efectoras, imagen tomada de (Serapio-Palacios y Finlay, 2020). La translocación directa de las proteínas efectoras al citoplasma de la célula huésped conduce al fenotipo A/E, en la parte superior se observa una micrografía electrónica de pedestales señalados por flechas amarillas sobre células de mamíferos infectadas, en el cuadro pequeño se visualizan dos bacterias EPEC en verde infectando a células HeLa en morado, imagen de J.A. Girón tomada de (Bhatt *et al.*, 2011).

El SSTIII es una nanojeringa molecular dispuesta en componentes que envuelven a la membrana interna y externa de la bacteria, y finaliza en una aguja insertada en el interior de la célula huésped a través de la cual se translocan las proteínas efectoras, los elementos estructurales del SSTIII se agrupan en apéndices extracelulares, cuerpo basal y componentes citoplasmáticos (Figura 3) (Slater *et al.*, 2018, Serapio-Palacios y Finlay, 2020).

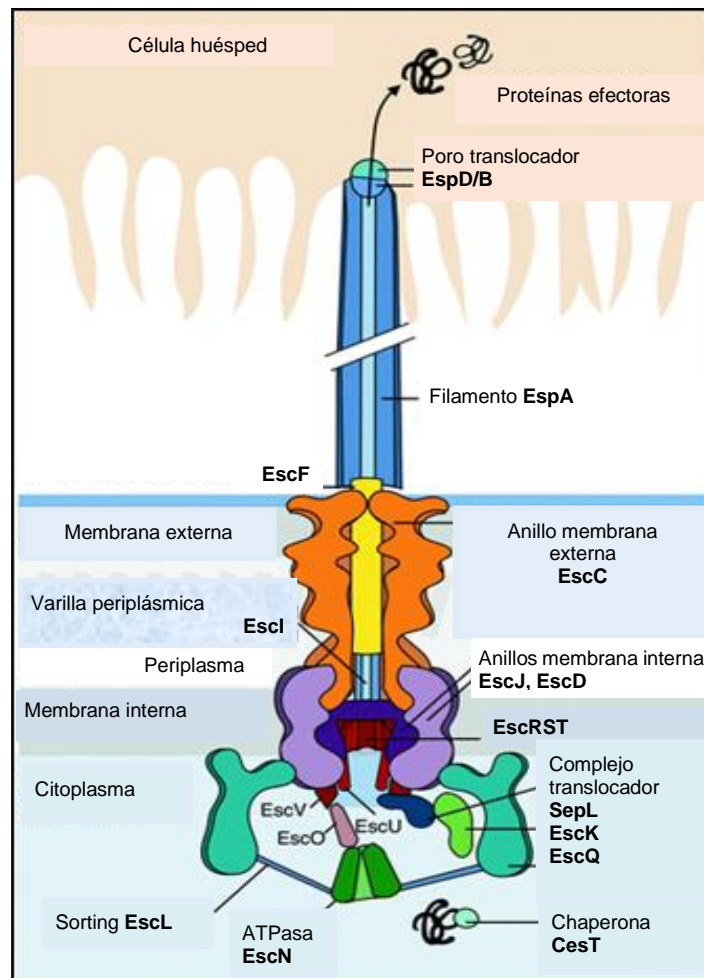


Figura 3. Representación esquemática del SSTIII de EPEC.

El SSTIII está organizado en tres estructuras principales: apéndices extracelulares, cuerpo basal y componentes citoplasmáticos. Los apéndices extracelulares están integrados por un poro translocador (EspB/D), una aguja (EscF) y un filamento (EspA). El cuerpo basal está formado por tres anillos, el anillo de membrana externa (EscC) y dos anillos concéntricos insertados en la membrana interna (EscD y EscJ), los cuales se encuentran conectados a través de la varilla periplásmica (EscI), los anillos localizados en la membrana interna contienen al aparato de exportación (EscR, EscS, EscT, EscU y EscV). Los componentes citoplasmáticos están constituidos por el complejo ATPasa citoplasmático (EscN, EscL y EscO), el "sorting" o plataforma de clasificación (EscK, EscQ y EscL) y el complejo translocador (SepL). Imagen tomada y modificada de (Slater *et al.*, 2018).

De manera adicional, fuera de la isla LEE se ubican genes que codifican para otros efectores y que son translocados al enterocito mediante el SSTIII, éstos comprenden 17 genes denominados *nle* (non-LEE encoded) los cuales se ubican en elementos integrativos y profagos. Una segunda isla de patogenicidad codifica para la proteína EspC, proteína que pertenece a la familia de autotransportadores de membrana y es secretada por el sistema de secreción tipo V y translocada al interior de la célula huésped a través del SSTIII, en donde produce un efecto citotóxico por su actividad de proteasa de serina (Navarro-García *et al.*, 2004; Serapio-Palacios y Finlay, 2020).

Mecanismo de patogenicidad de EPEC

La patogénesis de EPEC se describe en un modelo de tres etapas: adherencia inicial, transducción de señales y adherencia íntima (Figura 4) (Donnenberg y Kaper, 1992). En la adherencia inicial o adherencia no íntima, la bacteria reconoce las microvellosidades del epitelio intestinal a través de la fimbria BFP, causando el fenotipo LA, el reconocimiento mediado por BFP confiere la autoagregación bacteriana y el establecimiento de microcolonias sobre la superficie de la célula intestinal (Figura 4A) (Donnenberg y Kaper, 1992; Nataro y Kaper, 1998); EPEC coexpresa un factor de adherencia accesorio, la fimbria ECP (*E. coli* Common Pilus) que favorece la unión de la bacteria al epitelio intestinal y las interacciones bacteria-bacteria (Saldaña *et al.*, 2009).

La transducción de señales inicia con la eliminación de las microvellosidades, la promoción de la expresión y ensamblaje del SSTIII y, la translocación de proteínas efectoras (sus funciones se describen en la tabla 1) desde el citoplasma de la bacteria hasta el citoplasma de la célula huésped (Nataro y Kaper, 1998). La interacción directa entre el SSTIII y la célula intestinal se produce a través del reconocimiento de niveles altos de colesterol presentes en la célula hospedera, este reconocimiento favorece la translocación de la proteína Intimina y su receptor Tir, posterior a ello, son translocadas el resto de la proteínas efectoras EspF, EspG, EspH, EspZ y Map (Figura 4B). Estos efectores irrumpen los procesos celulares en el huésped causando alteraciones en la transducción de señales que producen daño

en la función mitocondrial, en los transportadores de nutrientes y disrupción de las uniones oclusivas; lo que conduce a la pérdida de electrolitos y a la muerte celular (Kaper *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2011). Además de los efectores LEE, EPEC transloca proteínas efectoras Nle, estas proteínas participan en las alteraciones del citoesqueleto y uniones estrechas de la célula huésped, así como en la modulación de la respuesta inflamatoria, que contribuyen al aumento de la virulencia bacteriana (Vossenkämper *et al.*, 2011; Raymon *et al.*, 2013; Santos y Finlay, 2015).

La adherencia íntima, se genera a través de la interacción proteína Intimina-receptor Tir, el receptor Tir previamente translocado a la célula huésped es fosforilado por la cinasa del hospedero (c-Fyn) en un residuo de tirosina localizado en la posición 474 (Tyr474). Posterior a su fosforilación, la proteína Tir se ancla sobre la membrana apical del enterocito en donde actúa como receptor de la proteína Intimina ubicada en la membrana externa de EPEC, promueve la reorganización del citoesqueleto a través de su estructura expuesta al citosol de la célula huésped mediante la cual recluta proteínas del citoesqueleto. Tir se une inicialmente a la proteína Nck (Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein), la cual, recluta el extremo amino de la proteína N-WASP (Neural-Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) y éste al complejo Arp2/3 (Actin-related protein 2/3), posterior a su reclutamiento, el complejo Arp2/3 se activa y produce el borramiento de las microvellosidades y la nucleación de los filamentos de actina que lleva al inicio de la formación del complejo pedestal característico de la infección por EPEC (Figura 4C). Este complejo adicionalmente enlista a otras proteínas citoesqueléticas como α -actina, cortactina, talina y ezrina; las cuales participan en la reticulación de los microfilamentos de actina (Kenny, 1999; Vallance y Finlay, 2000; Kaper *et al.*, 2004).

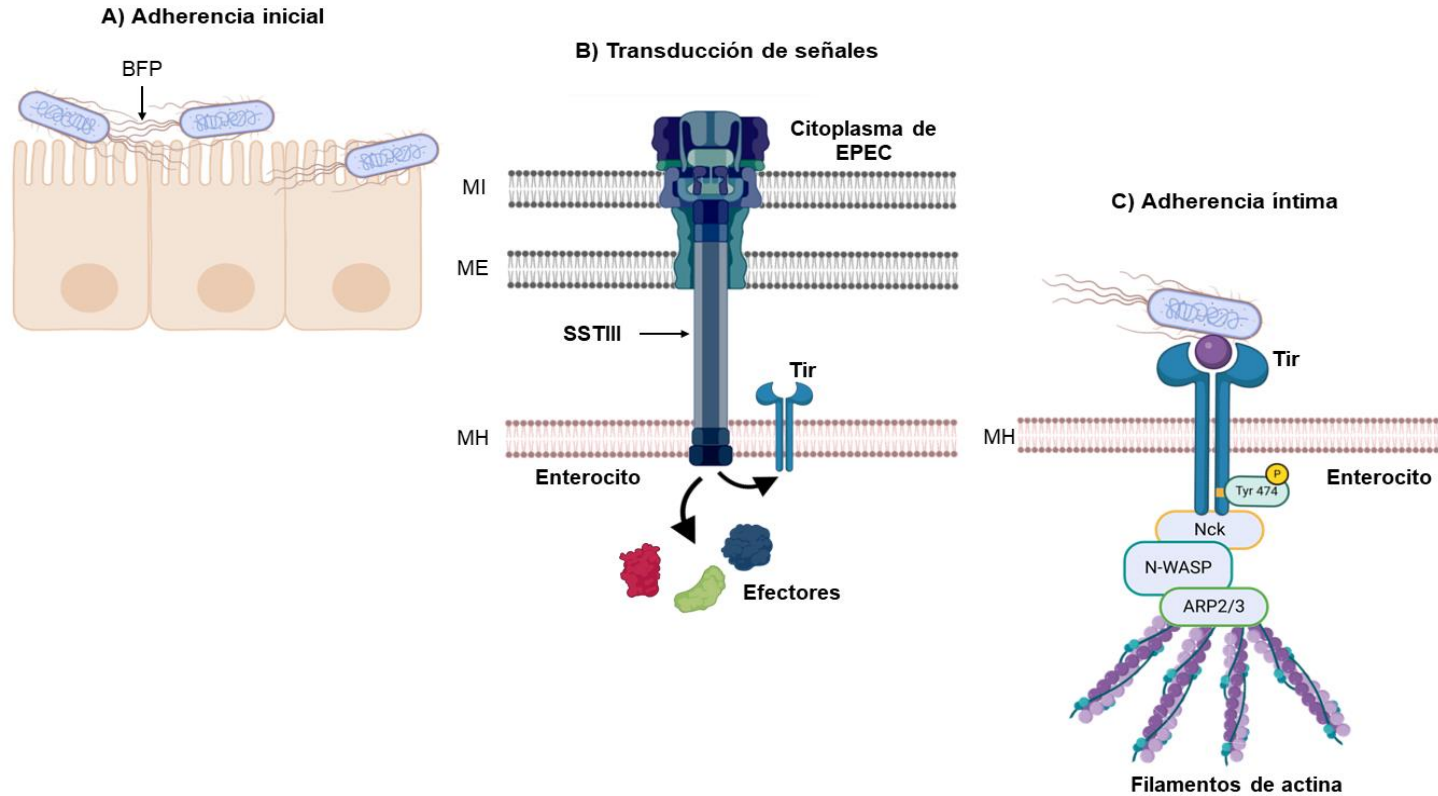


Figura 4. Etapas del mecanismo de patogénesis de EPEC.

A) Adherencia inicial, adherencia no íntima de EPEC al epitelio intestinal a través de la fimbria BFP, que produce el fenotipo de LA. **B)** Transducción de señales, comprende la translocación de proteínas efectoras a través del SSTIII y la generación de alteraciones en los procesos celulares de la célula hospedadora (daño mitocondrial, alteración en los transportadores de nutrientes y pérdida de uniones estrechas) que conducen a la supervivencia de EPEC. **C)** Adherencia íntima mediada por la interacción entre la proteína Intimina (esfera morada)-receptor Tir, esta interacción lleva a la formación de estructuras en forma de pedestal debajo de las bacterias adherentes, el receptor Tir promueve la reorganización del citoesqueleto de la célula a través de la unión con proteínas asociadas en el reclutamiento de actina y otras proteínas citoesqueléticas que en conjunto contribuyen a la formación del complejo pedestal. MI: Membrana interna, ME: Membrana externa, MH: Membrana del huésped. Imagen basada en: (Nataro y Kaper, 1998). Imagen creada en: BioRender.com

Tabla 1

Proteínas efectoras y función.

Proteínas efectoras LEE	
Proteína LEE	Función
Tir	Receptor de la proteína de membrana externa Intimina, esta proteína es necesaria para la histopatología A/E y la virulencia (Kenny <i>et al.</i> , 1997; Marches <i>et al.</i> , 2000; Deng <i>et al.</i> , 2003; Ritchie <i>et al.</i> , 2003).
EspF	Contribuye a la pérdida de las uniones estrechas (Guttman <i>et al.</i> , 2006; Peralta-Ramírez <i>et al.</i> , 2008), causa alteraciones en las microvellosidades y en el funcionamiento mitocondrial promoviendo con ello la apoptosis (Nagai <i>et al.</i> , 2005; Dean <i>et al.</i> , 2006; Dean <i>et al.</i> , 2010), inhibe la fagocitosis (Tahoun <i>et al.</i> , 2011) y activa la remodelación de la membrana a través del reclutamiento de N-WASP (Alto <i>et al.</i> , 2007).
EspG	Promueve la desestabilización de microtúbulos de la célula epitelial al interactuar con la tubulina, favorece la formación de fibras de estrés de actina (Tomson <i>et al.</i> , 2005), causa alteraciones en la permeabilidad paracelular epitelial (Matsuzawa <i>et al.</i> , 2005), al unirse a sus blancos (factor de ribosilación ADP GTPasa, quinasas activadas por p21 y GM130) interrumpe la función del aparato de Golgi (Selyunin y Alto, 2011; Clements <i>et al.</i> , 2011).
EspH	Participa en la formación de pedestales a través de la modulación de la actina y el reclutamiento de N-WASP y Arp2/3 (Tu <i>et al.</i> , 2003; Wong <i>et al.</i> , 2012).
EspZ	Provee de protección contra la muerte celular a la célula huésped mediante el mantenimiento del potencial de membrana, la retención del citocromo C dentro de la misma y la inhibición de la acción de las caspasas 3,7 y 9 (Roxas <i>et al.</i> , 2012).
Map	Afecta la integridad de las uniones estrechas (Ma <i>et al.</i> , 2006), induce filopodios (Kenny <i>et al.</i> , 2002), este efector adicionalmente causa alteración de la función mitocondrial (Kenny y Jepson, 2000; Dean y Kenny, 2004).
Proteínas efectoras Nle	
Proteína Nle	Función
NleA (EspI)	Inhibe el transporte vesicular al unirse a Sec24 (Kim <i>et al.</i> , 2007; Thanabalasuriar <i>et al.</i> , 2012).
NleB	Reprime la señalización proinflamatoria mediante el bloqueo de la translocación nuclear de la subunidad NF- κ B p65 (Newton <i>et al.</i> , 2010).
NleC	Metaloproteasa de Zinc responsable de la represión de la secreción de IL a través de la escisión de NF- κ B y de la acetiltransferasa p300 (Yen <i>et al.</i> , 2010; Baruch <i>et al.</i> , 2011; Pearson <i>et al.</i> , 2011; Sham <i>et al.</i> , 2011).
NleE	Inhibe la activación de NF- κ B mediante el bloqueo de la degradación de I κ B (Nadler <i>et al.</i> , 2010; Vossenkamper <i>et al.</i> , 2010).
NleH	Inhibe la respuesta inmune innata a través de su unión con la proteína ribosómica humana S3 (cofactor del complejo transcripcional NF- κ B) (Gao <i>et al.</i> , 2009; Pham <i>et al.</i> , 2012), también reprime la apoptosis mediante su interacción con el inhibidor de Bax-1 (Hemrajani <i>et al.</i> , 2010).
EspJ	Proteína con actividad anti-opsonofagocítica (Dahan <i>et al.</i> , 2005; Marches <i>et al.</i> , 2008).
Cif	Factor inhibidor del ciclo celular (no permite la transición de la fase G ₂ a la fase M) (Taieb <i>et al.</i> , 2006) e inductor de la apoptosis (Samba-Louaka <i>et al.</i> , 2009).

Antecedentes

Antecedentes generales

La expresión de los determinantes genéticos de virulencia en respuesta a cambios ambientales es esencial en los sistemas patógenos de muchas bacterias. En este sentido, una expresión no apropiada de los genes de virulencia lleva a la bacteria a un gasto metabólicamente alto y a la activación de los sistemas de defensa del huésped sobre la presencia de la bacteria previo a su colonización exitosa. Por esta razón, los genes de virulencia de muchas bacterias patógenas se encuentran sujetos a un mecanismo de estricta regulación que garantiza la expresión diferencial de estos genes en respuesta al ambiente circundante óptimo en el que se encuentren, favoreciendo de esta manera la expresión de los genes de virulencia y la permanencia en un nicho específico (Clarke *et al.*, 2003; Mellies *et al.*, 2007).

EPEC activa la expresión de los genes de la isla LEE en respuesta a señales ambientales. La expresión de la isla LEE promueve la colonización de la bacteria, previene la formación prematura del SSTIII y elude la respuesta inmune del huésped (Serapio-Palacios y Finlay, 2020).

En EPEC, las proteínas H-NS (Histone-like Nucleoid-Structuring protein), IHF (Integration Host Factor), FIS (Factor for Inversion Stimulation), BipA y QseA (Quorum-sensing E. coli regulator A) son los principales reguladores globales de los genes de virulencia (Abe *et al.*, 2008).

H-NS silencia los genes de la isla LEE, la unión del regulador a secuencias promotoras reprime la expresión de *LEE2*, *LEE3*, *LEE4* y *LEE5* a 27°C como a 37°C, sin embargo; la represión de *LEE1* (incluido *ler*) solo se produce a una temperatura de 27°C (Clarke *et al.*, 2003; Mellies *et al.*, 2007). H-NS también reprime la expresión de los operones *per* y *bfp* mediante la unión a sus regiones reguladoras (Figura 5) (Porter *et al.*, 2004). IHF y Fis regulan positivamente al operón *LEE1*, incrementando con ello la expresión de los genes LEE, Fis adicionalmente promueve la expresión de *LEE4* (Figura 5). BipA aumenta la transcripción de LEE a través de la activación de la expresión de *Ler*, y QseA activa directamente la transcripción del operón *LEE1* (Figura 5) (Mellies *et al.*, 2007; Serapio-Palacios y Finlay, 2020).

La isla LEE y el plásmido pEAF codifican los reguladores específicos de los genes de virulencia de EPEC, entre estos se encuentra el regulador Ler codificado por *LEE1* el cual modula de manera positiva la transcripción de los operones *LEE2*, *LEE3*, *LEE4*, *LEE5*, *espG-rorf1* y *grlR-grlA* (Figura 5); así como la transcripción de los genes *etgA*, *cesF*, *map* y *escD* (Elliott *et al.*, 2000; Barba *et al.*, 2005; Mellies *et al.*, 2007). Las condiciones ambientales a las cuales se activa Ler son 37°C y en presencia de autoinductores de detección de Quorum sensing (Serapio-Palacios y Finlay, 2020). Ler se encuentra controlado por los reguladores GrlA y GrlR codificados en LEE, el regulador positivo GrlA activa directamente la expresión de *ler* al liberar la represión mediada por H-NS al unirse al promotor *LEE1*, llevando a la expresión de Ler y a la promoción de la expresión de los genes de virulencia (Figura 5). La regulación mediada por GrlA se activa en medio DMEM a 37°C en agitación (Mellies *et al.*, 2007; Bustamante *et al.*, 2011). GrlR antagoniza a GrlA a través de la interacción proteína-proteína (Figura 5) regulando negativamente de esta manera a los genes de la isla LEE (Creasey *et al.*, 2003; Mellies *et al.*, 2007). GrlR también actúa como regulador negativo de la expresión de los operones *LEE1*, *LEE2*, *LEE3*, *LEE4* y *LEE5* en medio LB a 37°C (Figura 5), este efecto represor es a través de una vía alterna a la interacción con la proteína GrlA. El mecanismo utilizado por GrlR para la represión de los operones LEE es aún desconocido (Lara-Ochoa *et al.*, 2023).

Los reguladores específicos codificados por el plásmido pEAF son las proteínas PerA y PerC. PerA regula de manera indirecta a los genes LEE través de la proteína reguladora PerC que modula positivamente la expresión de *ler*, activando con ello directamente la transcripción de *LEE1* (Figura 5) y la del resto de los operones de la isla LEE (Gómez-Duarte y Kaper, 1995; Porter *et al.*, 2004), las condiciones *in vitro* que favorecen la regulación mediada por PerC son medio DMEM estático con 5% CO₂ (Bustamante *et al.*, 2011). El gen *perA* está sujeto a autorregulación (Mellies *et al.*, 2007), por lo que la proteína PerA actúa como su propio activador transcripcional y activador de los genes *perB* y *perC* y del operón *bfp*, y en efecto de la fimbria BFP (Figura 5); la expresión de *perA* se genera a lo

largo de la curva de crecimiento y llega a su máximo en la fase estacionaria temprana (Martínez-Laguna *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 2004).

La expresión del operón *perABC* es reprimida por GadX en condiciones ácidas (pH 5.5) (Figura 5) (Shin *et al.*, 2001).

Las condiciones ambientales *in vitro* que favorecen la expresión de los genes de virulencia son medio DME a 37°C, por el contrario, las condiciones no inductoras son el cultivo de EPEC en medio LB, presencia de sales de amonio y temperaturas menores o mayores a 37°C (Puente *et al.*, 1996; Martínez-Laguna *et al.*, 1999; Bustamante *et al.*, 2001).

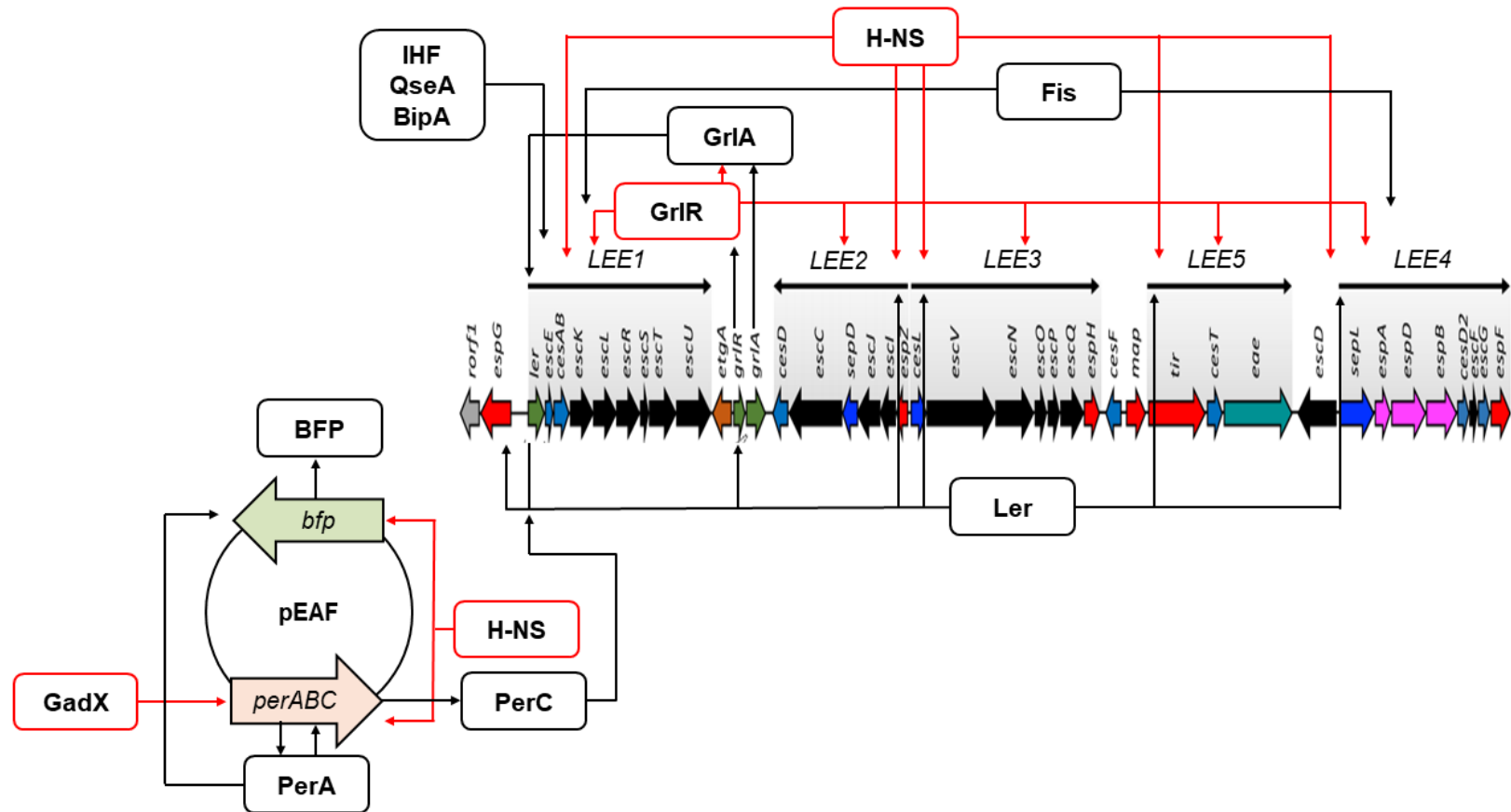


Figura 5. Esquema de la regulación de la expresión de los genes de virulencia de la isla LEE y el plásmido pEAF.

Regulación por reguladores globales (H-NS, IHF, FIS, BipA, QseA) y reguladores específicos (Ler, PerA y PerC). Las flechas negras muestran regulación positiva y las flechas rojas señalan represión. Isla LEE imagen tomada de (Serapio-Palacios y Finlay, 2020). Visualizar el texto para más detalles.

Antecedentes específicos

La proteína PerA de 31.8 kDa, también conocida como BfpT, es un activador transcripcional de promotores ubicados en el pEAF. Pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS, donde las proteínas de esta familia actúan como activadores de la expresión génica y tienen a su cargo la regulación de tres funciones principales, el metabolismo del carbono, la respuesta al estrés ambiental y la regulación de genes de virulencia (Gallegos *et al.*, 1997). Los miembros de la familia AraC/XylS poseen dos dominios estructurales, el dominio C-terminal y el dominio N-terminal (Mahon *et al.*, 2010). En el dominio C-terminal se localiza una región de aproximadamente 100 aminoácidos con dos motivos HTH (Helix-Turn-Helix) (Gallegos *et al.*, 1997; Martin y Rosner, 2001), uno o ambos de estos motivos se unen al DNA río arriba y en ocasiones río abajo de los promotores sobre los cuales actúan, el dominio C-terminal también posee sitios de interacción con la RNAP (RNA polimerasa) (Gómez-Duarte y Kaper, 1995; Munson y Scott, 2000; Munson *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2010). Por su parte, el dominio N-terminal es responsable de las interacciones con ligandos y de la oligomerización de proteínas (Figura 6) (Ruiz *et al.*, 2003; Parra y Collins, 2012).

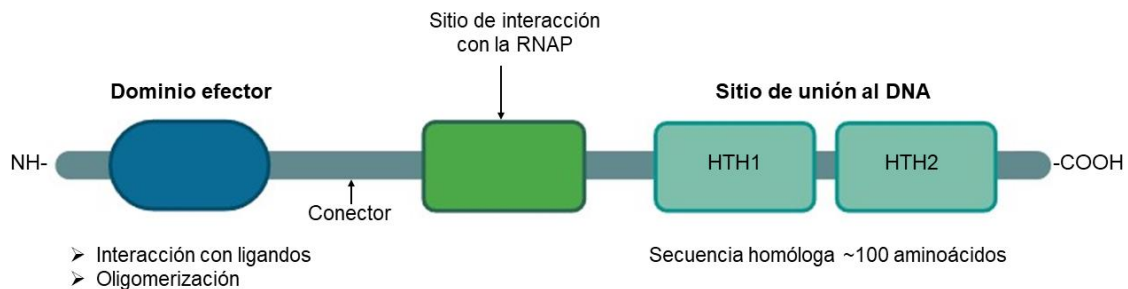


Figura 6. Esquema de la estructura general de los miembros de la familia AraC/XylS.

Las proteínas de la familia AraC/XylS tienen dos dominios estructurales, en el dominio N-terminal se localiza el dominio efector, éste tiene a su cargo la interacción con ligandos y la oligomerización de proteínas; el segundo dominio se ubica en el extremo C-terminal y está integrado por dos motivos HTH a través de los cuales los reguladores se unen al DNA de los genes que modulan. En algunos miembros de la familia adicionalmente en el C-terminal se ubica un sitio de unión a la RNAP. Imagen basada en: (Rhee *et al.*, 1998). Imagen creada en: BioRender.com

La proteína PerA regula los determinantes de virulencia de EPEC a través de la activación positiva de los promotores de *bfpA* (*PbfpA*) y *perA* (*PperA*). PerA activa el promotor río arriba de *bfpA* (Tobe *et al.*, 1996) y mediante la regulación de su propia expresión activa a su propio promotor (Martínez-Laguna *et al.*, 1999). Las dos vías reguladoras requieren de regiones ricas en AT río arriba de los respectivos promotores, las cuales integran los sitios potenciales de unión de PerA (Bustamante *et al.*, 1998; Martínez-Laguna *et al.*, 1999). PerA se asocia como monómero al activar la transcripción de los operones *per* y *bfp*, sus motivos HTH1 y HTH2 participan en el reconocimiento de la secuencia de unión al DNA de las regiones reguladoras de los genes *perA* y *bfpA* (Tobe *et al.*, 1996; Bustamante *et al.*, 1998; Martínez-Laguna *et al.*, 1999; Mellies *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 2004). Las secuencias necesarias para la unión de PerA a las regiones reguladoras de los operones *per* y *bfp* se localizan en las posiciones entre -75 y -47 en *perA* y entre -85 y -46 en *bfpA* (Bustamante *et al.*, 1998; Ibarra *et al.*, 2003).

Lara-Ochoa y colaboradores, identificaron la interacción de PerA con el dominio C-terminal de la subunidad α de la RNAP, esta interacción muestra a PerA como un regulador específico que establece contactos con la maquinaria transcripcional. Interacción necesaria para la expresión de *perA* y *bfpA* (Lara-Ochoa *et al.*, 2021). La interacción de proteínas de la familia AraC/XylS con la subunidad α de la RNAP ha sido reportada para SoxS, MarA, Rob, RhaR, XylS y XylS1 (Kam-Wing *et al.*, 1996; Holcrof y Egan, 2000; Ruiz *et al.*, 2001; Ruiz y Ramos, 2001).

En el 2014, Santiago y colaboradores identificaron y caracterizaron una nueva familia de reguladores negativos anti-AraC/XylS presentes en bacterias gram negativas, esta nueva familia fue denominada ANR (AraC family Negative Regulator); comprende aproximadamente 50 proteínas presentes en 7 principales especies bacterianas que incluye: *E.coli*, *Citrobacter spp.*, *Haemophilus spp.*, *Mannheimia spp.*, *Pantoea spp.*, y *Aggregatibacter spp.*, los reguladores que pertenecen a esta nueva familia se caracterizan por estar constituidos de 39 a 80 aminoácidos y tener una masa molecular pequeña de 4.36 a 9.54 kDa (Santiago *et al.*, 2014).

En este estudio caracterizaron a Aar (AggR activated Regulator) en la cepa prototipo EAEC 042 para proponer a la nueva familia ANR. Aar es una proteína de 63 aminoácidos y con un peso molecular de 7.23 kDa que regula negativamente la expresión del regulador positivo AggR (miembro de la familia AraC/XylS) y de 44 genes que forman parte del regulón AggR; estos comprenden genes que codifican para las fimbrias de adherencia agregativa (AAF/II), para la proteína de superficie de dispersina, para el sistema de secreción de dispersina Aat y para el sistema de secreción Aai tipo VI (Morin *et al.*, 2013; Santiago *et al.*, 2014; Santiago *et al.*, 2016). AggR es un activador transcripcional de *aar*, el gen que codifica para Aar, por lo que Aar funciona como regulador de retroalimentación negativa sobre el propio gen *aggR* (Figura 7), ambas proteínas participan en un circuito de regulación necesario para controlar la activación así como la represión de los genes de virulencia en la cepa prototipo EAEC 042 dependiendo de las condiciones ambientales (Santiago *et al.*, 2014).

Aar se encuentra constituida por 3 α hélices necesarias para su oligomerización, no posee motivos de unión al DNA, por lo cual su acción de regulación negativa sobre AggR la realiza a través de la interacción proteína-proteína. Los aminoácidos necesarios para esta interacción se localizan en las α hélices 2 y 3, estos aminoácidos están conservados en todos los reguladores de la familia ANR (Santiago *et al.*, 2014; Santiago *et al.*, 2016).

La proteína Aar modula la expresión de más de 200 genes que participan en la regulación, el transporte, el metabolismo y la patogénesis; la modulación de estos genes la realiza a través de la interacción directa con H-NS mediante la cual regula el silenciamiento de los genes inducido por H-NS (Santiago *et al.*, 2017).

Durante la etapa inicial de la infección por EAEC, H-NS se encuentra unida al DNA (incluyendo a los genes regulados por AggR), cuando la bacteria llega a su sitio de colonización se induce la expresión de *aggR*, posterior a esta inducción; AggR activa la expresión de *aar* (Figura 7). Aar se une a H-NS conduciendo a un incremento de los genes regulados por AggR, a medida que se incrementa la expresión de *aar*, Aar se une a AggR. Esta interacción tiene como resultado la inhibición de la dimerización y la activación de AggR y en consecuencia la represión

de los genes regulados por AggR (Figura 7). Lo expuesto anteriormente evidencia la funcionalidad dual de Aar en el circuito de regulación Aar-H-NS y Aar-AggR en la expresión de los genes de virulencia en la cepa prototipo EAEC 042 (Santiago *et al.*, 2017; Mickey y Nataro, 2020).

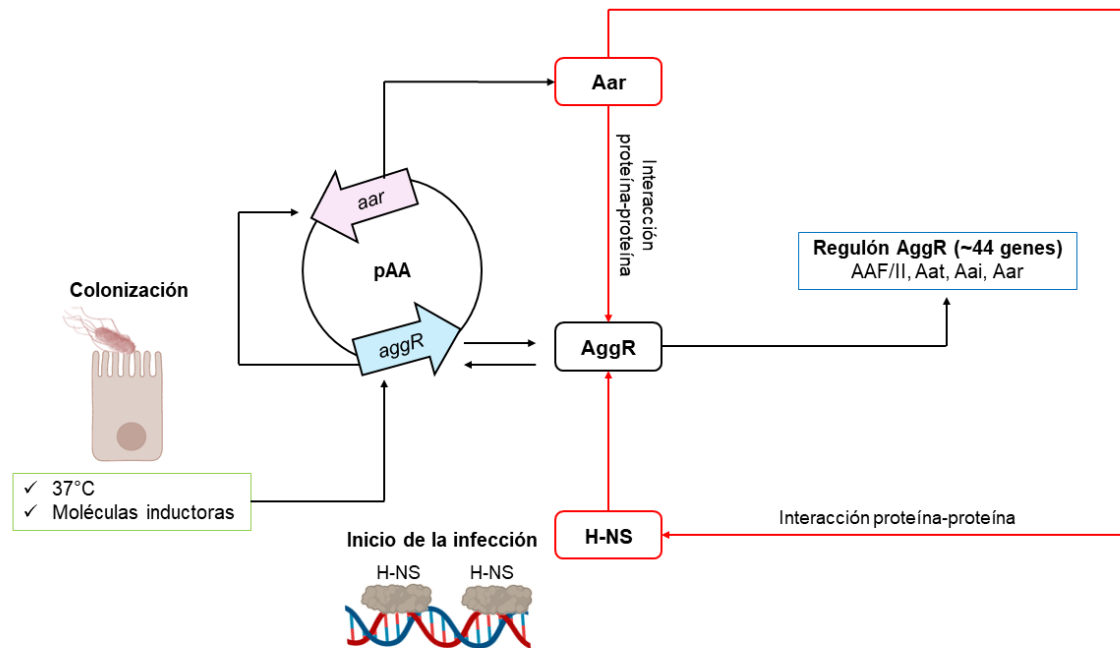


Figura 7. Esquema de la regulación de la expresión de los genes de virulencia en la cepa prototipo EAEC 042.

Al inicio de la infección H-NS está unida al DNA, cuando la bacteria llega a su sitio de colonización se induce la expresión de *aggR*, con esta inducción, AggR activa la expresión de los ~44 genes que conforman al regulón AggR así como a *aar*; Aar interactúa con H-NS y genera el silenciamiento inducido por éste último, lo anterior conduce a un aumento de los genes regulados por AggR (incluyendo *aar*), Aar interactúa con AggR impidiendo su dimerización y su activación, teniendo como consecuencia la represión de los genes que están bajo su regulación. Las flechas negras señalan regulación positiva y las flechas rojas indican represión. Consultar el texto para más detalles.

Los reguladores de la familia ANR identificados y caracterizados en los patotipos de *E. coli* se dividen en dos subfamilias principales SF1 y SF2. En la subfamilia SF1 se encuentran los homólogos de Aar con una similitud de aminoácidos del 44 al 58% y una identidad del 21.3 al 41.5%, la subfamilia SF1 comprende homólogos presentes en EHEC, EPEC, STEC, ETEC, ExPEC y EIEC. La subfamilia SF2 incluye a los homólogos con una similitud de aminoácidos de 72 al 100% y una identidad de 55.9 al 100%, en esta subfamilia se encuentran principalmente ETEC, EAEC y EAEC productora de Stx (Santiago *et al.*, 2014).

Entre los patotipos diarrogénicos de *E. coli* que poseen un regulador de la familia ANR se encuentra EPEC (E2348/69) serotipo O127:H6, el gen *rnr* con un tamaño de 234 pb localizado en el cromosoma codifica para la proteína Rnr (RegA negative regulator) con una masa molecular de 8.91 kDa, 37.8% de similitud y 26.8% de identidad con la proteína Aar (Santiago *et al.*, 2014; Jaramillo, 2019). Rnr es una proteína soluble de 77 aminoácidos, la predicción de la estructura de esta proteína reveló una estructura secundaria de tres α hélices principales y una cuarta α hélice pequeña. *rnr* está flanqueado río arriba por el gen *E2348C_2634* y río abajo por el gen *E2348C_2636* (las últimas 20 pb de *rnr* se empalman con *E2348C_2636*), estos dos genes se encuentran en la misma orientación que *rnr* (Jaramillo, 2019).

En nuestro laboratorio identificamos que la proteína Rnr tiene un efecto represor a nivel transcripcional sobre los genes que son regulados por PerA, estos incluyen genes que son codificados en el pEAF (*bfpA*, *perC* y *perA*) así como genes que son regulados de manera indirecta en la isla LEE (*espA*, *espB* y *escJ*) (Jaramillo, 2019). Análisis *in silico* sugieren que el efecto represor de Rnr sobre la expresión de genes regulados por PerA ocurre a través de la interacción proteína-proteína, los sitios putativos de esta interacción comprenden los aminoácidos 21 al 67 en Rnr (residuos altamente conservados en la familia ANR) y aminoácidos 116 al 172 en PerA (Mora, 2022).

Las condiciones de crecimiento que contribuyen a la expresión del gen *rnr* son medio DMEM y LB a 37°C, bajo estas condiciones *rnr* se expresa en bajas cantidades desde las etapas tempranas de la curva de crecimiento bacteriano, su expresión disminuye durante la fase exponencial y la fase estacionaria; mientras

que en medio DMEM suplementado con 20 mM de sulfato de amonio a 37°C (condiciones que reprimen la expresión de los genes de virulencia) se observa una mayor expresión de *rnr* desde las etapas tempranas de la curva de crecimiento y experimenta un decremento de manera gradual a lo largo de la misma (Jaramillo, 2019).

Recientemente, Rodríguez-Valverde y colaboradores mediante análisis RNA-seq identificaron que *rnr* modula la expresión de más de 500 genes, entre ellos los que codifican para el metabolismo, transporte de proteínas, regulación, actividad ribosómica y virulencia (incluyendo adherencia bacteriana y motilidad). Rnr regula negativamente genes que codifican para las proteínas estructurales del SSTIII (*espA*, *espB* y *espD*), genes que participan en la adherencia (*bfpA*, *eae* y *tir*) y genes que codifican para las proteínas reguladoras H-NS, Ler y PerA (Rodríguez-Valverde *et al.*, 2023).

Justificación

La morbilidad y la mortalidad asociada a infecciones intestinales representan un importante problema de salud pública en países en vías de desarrollo. EPEC es uno de los principales agentes de la diarrea infecciosa en niños que residen en estos países, la capacidad de este patotipo diarrogénico para colonizar el intestino delgado se le atribuye a la presencia de un conjunto de genes de virulencia sujetos a un control estricto de diversas proteínas reguladoras que responden a diferentes condiciones ambientales. Uno de los reguladores importantes es PerA, el cual activa la transcripción de genes de virulencia localizados en el pEAF y también de manera indirecta genes en la isla LEE. Dada la importancia de PerA en el mecanismo de patogenicidad de EPEC su expresión es controlada por diversos reguladores, uno de ellos es Rnr miembro de la familia ANR que reprime la transcripción de PerA por un mecanismo todavía desconocido.

De acuerdo con la secuencia del genoma de EPEC (E2348/69) serotipo O127:H6, el gen *rnr* está flanqueado río arriba por el gen *E2348C_2634* y río abajo por el gen *E2348C_2636*, estos genes se encuentran en la misma orientación que *rnr* por lo que es probable que se encuentren formando un operón. En este sentido, el estudio de la organización genética de *rnr* permitirá generar información sobre la expresión de este importante represor de la virulencia de EPEC.

Hipótesis

Los genes *E2348C_2634*, *rnr* y *E2348C_2636* se transcriben como un operón.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar la organización transcripcional del gen *rnr* en EPEC WT.

Objetivos específicos

- Analizar la organización transcripcional del gen *rnr* en el genoma de EPEC a través de herramientas bioinformáticas.
- Evaluar la expresión de *rnr* bajo condiciones de crecimiento de inducción y represión de genes de virulencia.
- Evaluar la expresión de los genes *E2348C_2634*, *rnr* y *E2348C_2636* como unidades transcripcionales independientes y como operón en condiciones de inducción y represión de genes de virulencia.

Materiales y métodos

Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento

La cepa bacteriana y los oligonucleótidos utilizados en este estudio se describen en la tabla 2. La cepa se cultivó de forma rutinaria en medio LB (Luria-Bertani) que contiene peptona de caseína (1%), extracto de levadura (0.5%) y cloruro de sodio (1%), o en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) que incluye glucosa (0.45%) y L-glutamina (584 mg/L), sin piruvato de sodio (Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), suplementado con 1% de LB. A los medios se le adicionó estreptomina (Sm) (100mg/ml). Para la inducción de la expresión de los genes de virulencia las bacterias se cultivaron en medio DMEM a 37°C/190 rpm, mientras que el medio LB y DMEM suplementado con 20 mM de sulfato de amonio se ocuparon como condiciones no inductoras o represoras.

Tabla 2

Cepa y oligonucleótidos usados en este estudio.

Cepa bacteriana			
Cepa bacteriana	Descripción	Referencia	
E2348/69	EPEC Wild-type O127:H6, Sm ^R	J.B. Kaper	
Oligonucleótidos			
Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Descripción	Referencia
perA-RTF	CACTCATTGGGACATGG	Amplifica la región interna de <i>perA</i> para RT-PCR punto final	Lara-Ochoa <i>et al.</i> , 2021
perA-RTR	TTCATTGAGGTTGCGAG		
gyrB-RTF	ACCATTCACGCCGATAACTC	Amplifica la región interna de <i>gyrB</i> para RT-PCR punto final	
gyrB-RTR	GGGCGTTTACTACCGAAACA		

Diseño de oligonucleótidos

Se realizó la búsqueda del gen *rnr* en el genoma completo de EPEC E2348/69 serotipo O127:H6 en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (2,721,409-2,721,642, GenBank: FM180568.1),

posteriormente, se procedió a localizar los genes que flanquean a *rnr*, *E2348C_2634* (2,720,763-2,721,407, GenBank: FM180568.1) y *E2348C_2636* (2,721,623-2,721,814, GenBank: FM180568.1); las secuencias de los genes se descargaron en formato FASTA y fueron analizadas en el programa SnapGene versión 7.0.

Los oligonucleótidos se diseñaron en el programa SnapGene versión 7.0 y la temperatura de estos se calculó manualmente efectuando la siguiente operación: $2(A+T) + 4(C+G)$. Una vez diseñados los oligonucleótidos, fueron sometidos a Blastn en la base de datos del NCBI para descartar la complementariedad con otra secuencia que no fuera la del gen de interés en el genoma de EPEC. Después de la evaluación de los oligonucleótidos, estos se mandaron a sintetizar a la compañía T4 OLIGO. En la tabla 3 se indican las secuencias de los oligonucleótidos diseñados en este estudio. Todos los oligonucleótidos se diluyeron a una concentración de 10 μ M.

Tabla 3

Oligonucleótidos diseñados en este estudio.

Oligonucleótido	Secuencia (5´ - 3´)	Descripción	Referencia
E2348C_2634-F	ACGACTGAAAATAAAGTTAAGC	Amplifica la región estructural de <i>E2348C_2634</i> para RT-PCR punto final	En este estudio
E2348C_2634-R	AACCCCTGCAATATCAAGC		
rnr-F	CATCAGGATATCAAAGAGTAC	Amplifica la región estructural de <i>rnr</i> para RT-PCR punto final	
rnr-R	AAGCGTTTCGCGTTCATGA		
E2348C_2636-F	AACGCGAAACGCTTTAATCA	Amplifica la región estructural de <i>E2348C_2636</i> para RT-PCR punto final	
E2348C_2636-R	TGCGGTGCTTTCAGTGTTT		

Extracción de DNA genómico

La cepa bacteriana se cultivó en 5 ml de medio LB con estreptomina durante la noche a 37°C/160 rpm, al día siguiente; se concentraron las células a 12,000 rpm/ 2 min a temperatura ambiente (TA), el pellet se resuspendió en 570 µl de buffer SET (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, sacarosa 20%) y 30 µl de SDS (Dodecilsulfato Sódico) al 20%, y se incubó a 80°C por 5 min; posteriormente, se dejó enfriar a TA, y se le adicionó 200 µl NaCl 5M, el contenido se vortexeó durante 20 segundos, después, se incubó 5 min en hielo y se centrifugó a 13,000 rpm/ 5 min a TA, el sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó 800 µl de isopropanol y se mezcló por 1 min, luego, se centrifugó a 12,000 rpm/18 min a TA, el sobrenadante resultante fue desechado y el pellet fue lavado tres veces con 1 ml de etanol al 70%, el DNA obtenido se resuspendió en 140 µl de H₂O grado Biología Molecular y se guardó a -20°C hasta su uso.

PCR punto final

Las reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction) se realizaron con la enzima Dream Taq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), la cual se usó a una concentración final de 1X, los oligonucleótidos se emplearon a una concentración de 0.3 µM, y se ocupó ~1 µg de DNA genómico. Cada una de las reacciones fue preparada a un volumen final de 20 µl y efectuadas en el termociclador Prime (Techne) con los componentes indicados en la tabla 4 y bajo las condiciones señaladas en la tabla 5.

Tabla 4

Componentes de la PCR punto final.

Reactivo	Cantidad
H ₂ O libre de nucleasas	6.8 µl
Oligo F [10 µM]	[0.3 µM] en el volumen final
Oligo R [10 µM]	[0.3 µM] en el volumen final
Dream Taq Green PCR 2X	1X en el volumen final
DNA genómico	2 µl
Volumen final 20 µl	

Tabla 5

Condiciones de PCR punto final.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos	1
Desnaturalización	95°C	30 segundos	35
Alineamiento	56°C	1 minuto	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR se cargaron en geles de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X (40mM Tris, 19 mM Ácido Acético Glacial, 1 mM EDTA) y fueron separados en un rango de 70-100 volts por 2 horas. Posterior a la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio, los productos obtenidos se observaron en un fotodocumentador de luz ultravioleta (ChemicDoc XRS, Bio-rad).

Extracción de RNA

Se tomó 1 ml de un cultivo de toda la noche para inocular 50 ml de DMEM, 50 ml de LB y 50 ml de DMEM/NH₄⁺ y se incubaron en agitación a 190 rpm a 37°C hasta una DO₆₀₀ 0.8. De los cultivos se tomaron alícuotas de 20 ml, se centrifugaron a 6,000 rpm/15 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 500 µl de TRIzol Reagent (Invitrogen), se incubó por 5 min a TA. Después, se adicionó 100 µl de cloroformo y se incubó 5 min a TA mezclando constantemente, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm/15 min a TA, la fase acuosa obtenida (sobrenadante) se transfirió a un tubo nuevo, al cual se le agregó 250 µl de isopropanol, se mezcló y se incubó durante 5 min a TA, en seguida, se centrifugaron las muestras nuevamente a 12,000 rpm/15 min a TA, el pellet obtenido se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 80%, se decantó y se dejó secar por 15 min, posteriormente; se resuspendió en 80 µl de H₂O libre de nucleasas y se incubó a 60°C por 30 min (vortexeando cada 10 min), la concentración y la calidad del RNA se determinaron midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en el nanofotómetro Pearl (IMPLEN). El DNA genómico residual se eliminó mediante el tratamiento con DNAsa, se trataron 10 µg de RNA usando el kit RapidOut DNA Removal (Thermo Fisher Scientific), con los reactivos y las condiciones mostradas en las tablas 6 y 7. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Tabla 6

Reactivos para la eliminación de DNA residual utilizando el kit RapidOut DNA Removal.

Reactivo	Cantidad
RNA	Para 10 µg
DNAsa I	3 µl
Buffer (DNAsa + MgCl ₂) 10X	1X en el volumen final
H ₂ O libre de nucleasas	cbp*
Volumen final 20 µl	

*Cuanto basta para

Tabla 7

Condiciones de reacción para remover el DNA genómico.

Temperatura	Tiempo
37°C	2 horas
70°C	15 minutos

RT-PCR punto final

Posterior a la eliminación del DNA, la integridad de cada muestra de RNA se evaluó mediante RT-PCR punto final y electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Nuevamente se procedió a evaluar la concentración e integridad del RNA para realizar la síntesis de DNAc a partir de 1 µg de RNA utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific), las reacciones se realizaron con los reactivos y las condiciones visualizadas en las tablas 8 y 9.

Tabla 8

RT-PCR usando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis.

Reactivo	Cantidad
RNA	Para 1µg
Random Hexamer Primer	1 µl
Agua libre de nucleasas	cbp
Buffer de reacción 5X	1X en el volumen final
Inhibidor de RNAsa	1 µl
Mezcla dNTP's 10mM	2 µl
Retrotranscriptasa	1 µl
Volumen final 20 µl	

Tabla 9

Condiciones de RT-PCR.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
25°C	5 minutos	1
42°C	60 minutos	
70°C	10 minutos	

La síntesis de DNAc se usó para realizar RT-PCR punto final con el objetivo de evaluar la expresión de los genes *perA* y *rnr*, usando al gen *gyrB* como normalizador; el DNAc también se ocupó para evaluar la expresión de los genes *E2348C_2634*, *rnr* y *E2348C_2636* como unidades transcripcionales independientes y como operón. Las reacciones de RT-PCR punto final se elaboraron como se muestra en la tabla 10, utilizando las condiciones de la tabla 5.

Tabla 10

Componentes de la RT-PCR punto final.

Reactivo	Cantidad
H ₂ O	6.8 µl
Oligo F [10 µM]	[0.3 µM] en el volumen final
Oligo R [10 µM]	[0.3 µM] en el volumen final
Dream Taq Green PCR 2X	1X en el volumen final
DNAc	2 µl
Volumen total 20 µl	

Análisis bioinformáticos

Para la búsqueda de promotores y sitios putativos de unión de factores de transcripción se usó el programa BROM (www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb)

La cuantificación de la densidad (píxeles) de las bandas de la RT-PCR punto final se realizó con ImageJ.

De manera adicional, se analizó la organización genética de homólogos de *rnr* de la subfamilia SF1 para *E. coli* DEC8D (GenBank: AIGI01000037.1) y *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) ICC168 (GenBank: NC_013716.1).

Se efectuó el alineamiento global por pares (Pairwise alignment global) de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los genes que flanquean a *rnr* en EPEC y *C. rodentium* ICC168 utilizando la herramienta EMBOSS-Needle (https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss_needle)

Análisis estadístico

La normalización de la densidad se realizó en Excel y las gráficas con su respectiva desviación estándar se hicieron en GraphPad Prism versión 10.0.1 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

Resultados

Análisis *in silico* de la región promotora de *rnr*

Para el análisis bioinformático se utilizó una secuencia que comprende desde 150 pb río arriba con respecto al codón de inicio del gen *E2348C_2634* hasta la región estructural del gen *E2348C_2636* del genoma de EPEC (E2348/69) serotipo O127:H6 (GenBank:FM180568.1), y a partir de ésta se realizó la búsqueda de posibles promotores utilizando el programa BPROM, esta herramienta bioinformática permite la predicción *in silico* de sitios potenciales de inicio de la transcripción regulados por el factor σ^{70} , así como de las cajas -10 y -35 en la región del promotor, con un 80% de precisión y de especificidad (Solovyev y Salamov, 2011). A través de este análisis se identificaron 3 posibles promotores (Figura 8), en orden de mayor predicción son los siguientes: el primero con la caja -10 en la posición -7 “score 58” y la caja -35 “score 5” en la posición -28 con respecto al ATG del gen *rnr*, el segundo promotor se localiza con la caja -10 en la posición -13 “score 48” y la caja -35 “score 13” en la posición -33 respecto al ATG del gen *E2348C_2634* y el último promotor se ubica con la caja -10 en la posición -352 “score 35” y la caja -35 “score 47” en la posición -369 respecto al ATG del gen *rnr*. Estos resultados proponen las siguientes posibilidades: 1. Los genes *E2348C_2634*, *rnr* y *E2348C_2636* se encuentran formando un operón, por el promotor situado dentro de 150 pb río arriba de *E2348C_2634*, 2. El gen *E2348C_2634* se transcribe como unidad transcripcional independiente y, 3. Los genes *rnr* y *E2348C_2636* se transcriben como un operón de acuerdo con la predicción de dos promotores río arriba de *rnr* cada uno de estos con alta puntuación en su score.

Adicionalmente, río arriba de *E2348C_2634* se ubicaron sitios putativos para la unión de factores de transcripción (Tabla 11), estos fueron investigados en la base de datos del NCBI con el objetivo de confirmar si se localizan en el genoma de EPEC, los factores de transcripción identificados comprenden: Crp (proteína reguladora de AMPc), GlpR (represor de glicerol 3 fosfato), PhoB (regulador transcripcional en respuesta a fosfato) y H-NS; todos estos reconocidos en EPEC.

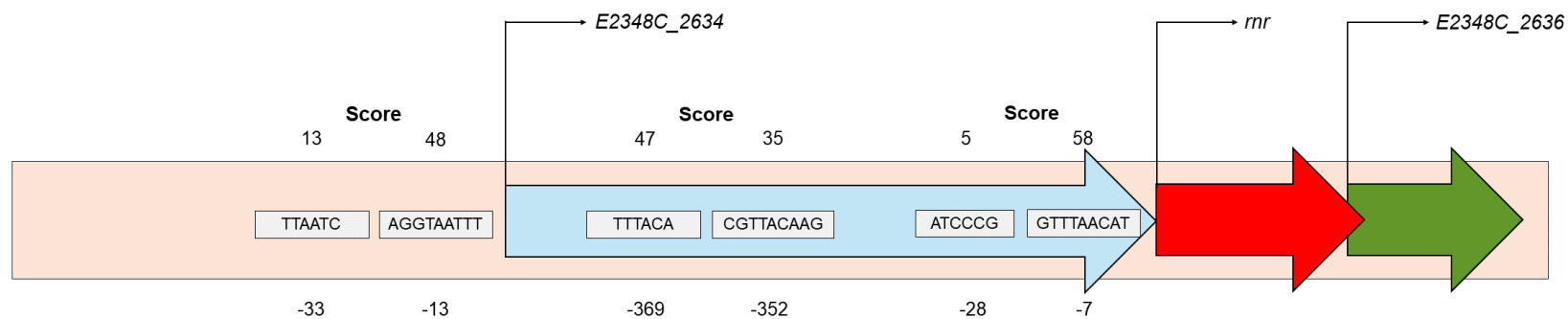


Figura 8. Esquema de la predicción de promotores de *E2348C_2634*, *rnr* y *E2348C_2636*.

La flecha azul representa al gen *E2348C_2634*, la flecha roja a *rnr* y la flecha verde a *E2348C_2636*. Río arriba de cada gen se ilustran con recuadros blancos las posibles cajas -10 y -35 con sus respectivas secuencias correspondientes identificados por el programa BPROM. En la parte inferior de cada recuadro la posición respecto al ATG de los genes *E2348C_2634* y *rnr*, en la parte superior el "score" de cada una de las predicciones. Las flechas negras indican el sitio de inicio y la orientación de la transcripción de cada gen. Esquema realizado con los resultados *in silico* obtenidos del programa BPROM.

Tabla 11

Sitios putativos de unión de factores de transcripción localizados río arriba de *E2348C_2634*.

Factor de transcripción	Secuencia	Posición	Score
Crp	ACACACAT	- 40	12
GlpR	CACACATT	-39	6
PhoB	TAATCTGT	-32	7
H-NS	TAATTTAA	-10	9
PhoB	TTTAATTA	-7	11

Organización genética de homólogos de *rnr* de la subfamilia SF1

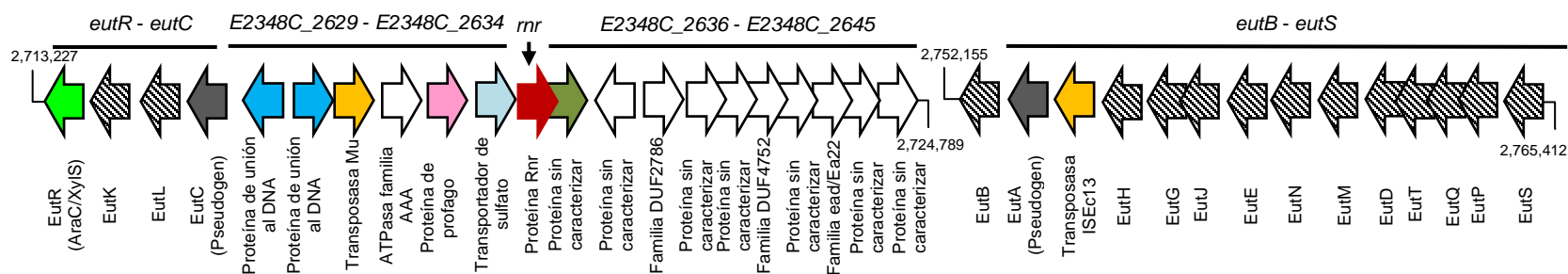
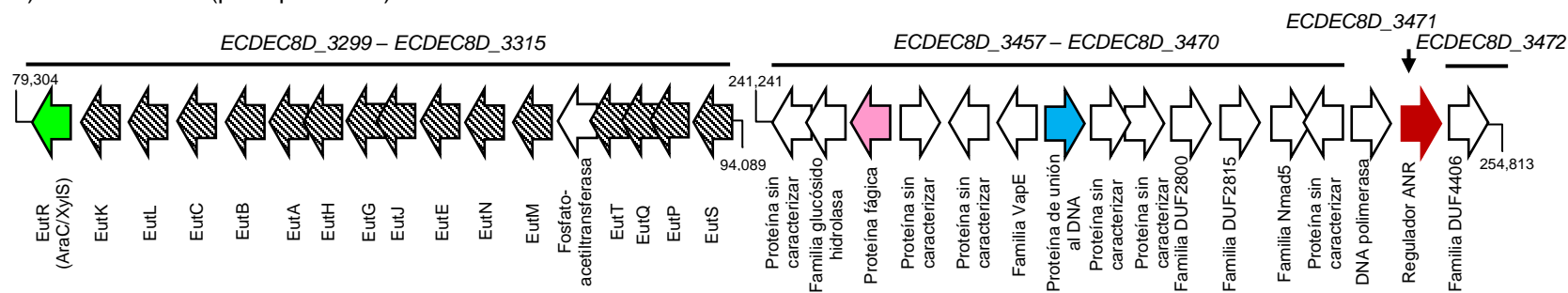
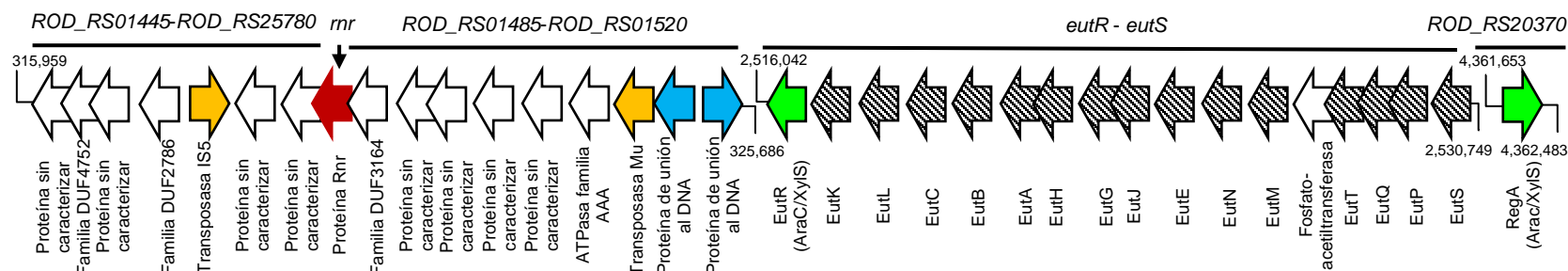
En este estudio se analizó la organización genética *in silico* de dos homólogos de *rnr* de la subfamilia SF1: *ECDEC8D_3471* de *E. coli* DEC8D patotipo EHEC y *rnr* de *C. rodentium* ICC168. Los resultados de las tres secuencias de DNA analizadas (*E. coli* O127:H6 GenBank:FM180568.1, *E. coli* DEC8D GenBank: AIGI01000037.1 y *C. rodentium* ICC168 GenBank: NC_013716.1) muestran cinco características conservadas entre EPEC O127:H6 y *C. rodentium* ICC168: dos proteínas de unión al DNA, una transposasa Mu, una ATPasa de la familia AAA (ATPases Associated with diverse cellular Activities) localizados río arriba de *rnr*, una proteína de la familia DUF2786 y una proteína de la familia DUF4752, éstas últimas ubicadas río abajo de *rnr* (Figura 9, A y C). Adicionalmente, los resultados indican que *rnr* de *C. rodentium* ICC168 está flanqueado río arriba por el gen *ROD_RS01485* (645 pb) y río abajo por el gen *ROD_RS25780* (192 pb, las últimas 20 pb de *rnr* se empalman con *ROD_RS25780*), estos genes se encuentran en la misma orientación que *rnr*, similar a la organización y orientación observada con su homólogo de EPEC con los genes *E2348C_2634* y *E2348C_2636* (Figura 9, A y C).

A diferencia de *E. coli* O127:H6 y *C. rodentium* ICC168 en *E. coli* DEC8D se encontró una proteína de unión al DNA río arriba de *ECDEC8D_3471*, la única característica que comparten *E. coli* DEC8D y *E. coli* O127:H6 es la presencia de una proteína fágica situada río arriba de *ECDEC8D_3471* y *rnr*, respectivamente (Figura 9, A y B).

Santiago y colaboradores proponen que los miembros de la familia ANR se encuentran codificados cerca y en dirección opuesta a la transcripción de la proteína de la familia AraC/XylS a la que regula (Santiago *et al.*, 2014). No obstante, PerA principal proteína AraC/XylS reguladora de los genes de virulencia en EPEC se sitúa en el pEAF. Al analizar la organización genética de *rnr* en *E. coli* O127:H6 se encontró que el miembro AraC/XylS más próximo a la ubicación de este miembro ANR es el gen *eutR* que codifica para la proteína EutR, el cual se ubica a 7,129 pb río arriba y en dirección opuesta de la transcripción de *rnr*. En *C. rodentium* ICC168 el gen *ROD_RS20370* (4,361,653-4,362,483, GenBank:NC_013716.1) que codifica para RegA (proteína AraC/XylS) la cual está regulada negativamente por Rnr

(Santiago *et al.*, 2014) se localiza río arriba y en dirección opuesta a la transcripción de *rnr*.

En el análisis de la organización genética de los homólogos de *rnr* de la subfamilia SF1 se identificó en *E. coli* O127:H6 una gran inserción en el operón *eut* (*ethanolamine utilization*) por parte del profago *E2348C_PP_9* (2,715,960-2,751,592; GenBank: FM180568.1) que contiene a *rnr*, esta inserción se localiza entre los genes *eutB* y *eutC* (Figura 9A), mientras que los homólogos de *rnr* en *E. coli* DEC8D y *C. rodentium* ICC168 poseen un operón *eut* intacto (Figura 9, B y C).

A) *E. coli* O127:H6 (EPEC)B) *E. coli* DEC8D (patotipo EHEC)C) *C. rodentium* ICC168**Figura 9. Organización genética de homólogos de *rnr* de la subfamilia SF1.**

Secuencias de DNA para (A) *E. coli* O127:H6 (2,713,227-2,724,789, 2,752,155-2,765,412; GenBank: FM180568.1), (B) *E. coli* cepa DEC8D (79,304-94,089, 241,241-254,813; Gen Bank: AIGI01000037.1), (C) *C. rodentium* ICC168 (315,959-325,686, 2,516,042-2,530,749, 4,361,653-4,362,483; GenBank: NC_013716.1).

Estandarización de las condiciones de amplificación de los genes *E2348C_2634*, *rnr* y *E2348C_2636*

Para determinar la organización genética de *rnr* se realizó la estandarización de las condiciones de reacción para la amplificación por PCR de los genes *E2348C_2634*, *rnr* y *E2348C_2636*, así como para *E2348C_2634-rnr*, *rnr-E2348C_2636* y *E2348C_2634-E2348C_2636*. Para esto, a partir de las muestras del DNA genómico extraído de la cepa EPEC (E2348/69) serotipo O127:H6 se efectuó la técnica de PCR punto final con los oligonucleótidos de la tabla 3 y las condiciones de reacción en el termociclador de la tabla 5. Los productos obtenidos se cargaron en un gel de agarosa al 1.5%, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un fotodocumentador de luz ultravioleta. En la figura 10 se muestran los productos amplificados de los genes *E2348C_2634* (639 pb), *rnr* (228 pb), *E2348C_2636* (186 pb), *E2348C_2634-rnr* (874 pb), *rnr-E2348C_2636* (400 pb) y *E2348C_2634-E2348C_2636* (1,046 pb); así como los controles no templados (NTC).

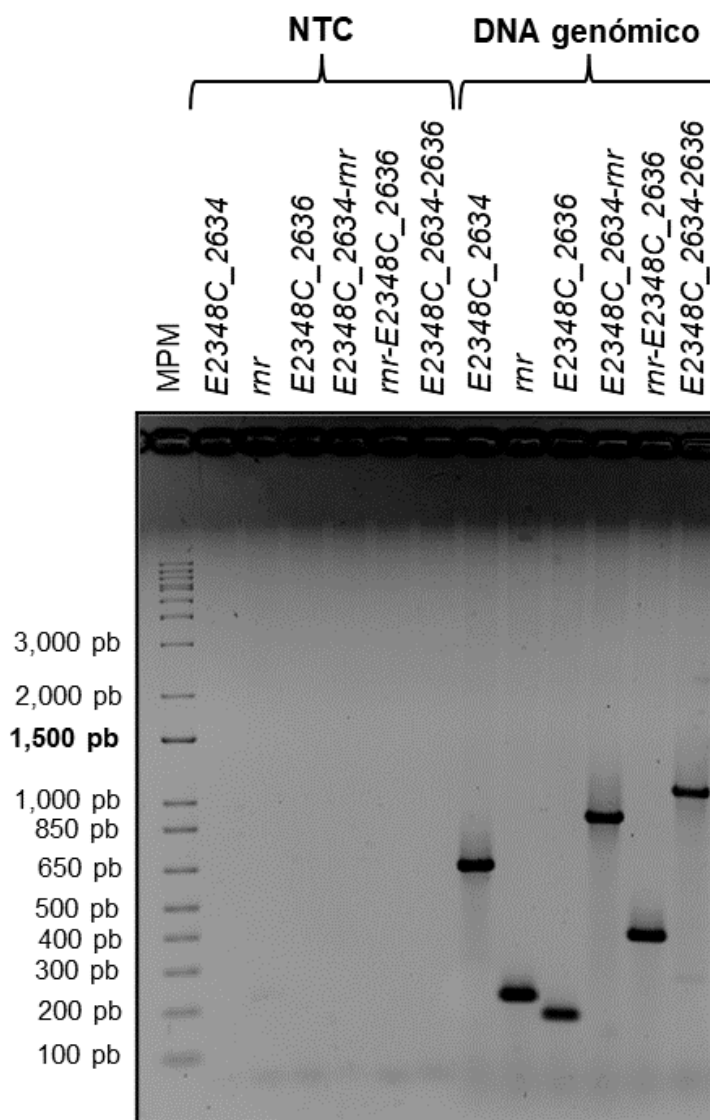


Figura 10. Estandarización de las condiciones de amplificación de los genes *E2348C_2634*, *rnr*, *E2348C_2636*, *E2348C_2634-rnr*, *rnr-E2348C_2636* y *E2348C_2634-E2348C_2636*.

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 marcador de peso molecular (MPM) (1 kb Plus, Thermo Scientific), carril 2-7 NTC (controles negativos de la reacción), carril 8-13 productos de PCR de *E2348C_2634* (639 pb, carril 8), *mr* (228 pb, carril 9), *E2348C_2636* (186 pb, carril 10), *E2348C_2634-rnr* (874 pb, carril 11), *rnr-E2348C_2636* (400 pb, carril 12) y *E2348C_2634-2636* (1,046 pb, carril 13). Los tamaños de los fragmentos del MPM se indican a la izquierda.

Expresión de *rnr* bajo diferentes condiciones de crecimiento

Para confirmar las condiciones a usar para la inducción de la expresión de *rnr*, EPEC WT se cultivó en medio DMEM (condición que induce la expresión de los genes de virulencia), así como en medio LB y DMEM/NH₄⁺ (condiciones que reprimen la expresión de los genes de virulencia) (Martínez-Laguna *et al.*,1999; Bustamante *et al.*,2001). Las muestras se recolectaron a una DO₆₀₀ 0.8 y fueron procesadas para la extracción de RNA y la síntesis de DNAC para evaluar la expresión de *rnr* y *perA* mediante RT-PCR punto final (los oligonucleótidos de este análisis se describen en la tabla 2 y 3). Las reacciones se realizaron por duplicado con dos preparaciones independientes de DNAC; los niveles de expresión para *rnr* y *perA* se normalizaron con *gyrB*. Los productos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (Figura 11A) y se analizaron en el programa ImageJ, los resultados de la expresión se graficaron en GraphPad Prism (Figura 11B).

Los resultados muestran que la expresión de *rnr* en medio DMEM es baja comparada a la expresión de *perA* que se observa en mayor cantidad, dato reportado previamente (Martínez-Laguna *et al.*,1999; Jaramillo, 2019), en esta condición de crecimiento la expresión de *rnr* fue 25.40% menos con respecto a la observada para *perA* (Figura11B, DMEM). Cuando EPEC es cultivada en DMEM/NH₄⁺, *rnr* presenta una expresión alta, contrario a lo que sucede con la expresión de *perA* la cual exhibió una reducción del 65.66% respecto a la expresión de *rnr* (Figura 11B, DMEM/NH₄⁺), estos datos coinciden con lo reportado (Jaramillo, 2019). La expresión de *rnr* en medio LB fue mayor que la expresión de *perA*, bajo esta condición *perA* tiene una disminución del 44.39% respecto a la expresión identificada para *rnr* (Figura 11B, LB), resultados que coinciden a lo reportado por Puente *et al.*,1996; Jaramillo, 2019. La expresión de *gyrB* no fue afectada bajo ninguna condición de crecimiento.

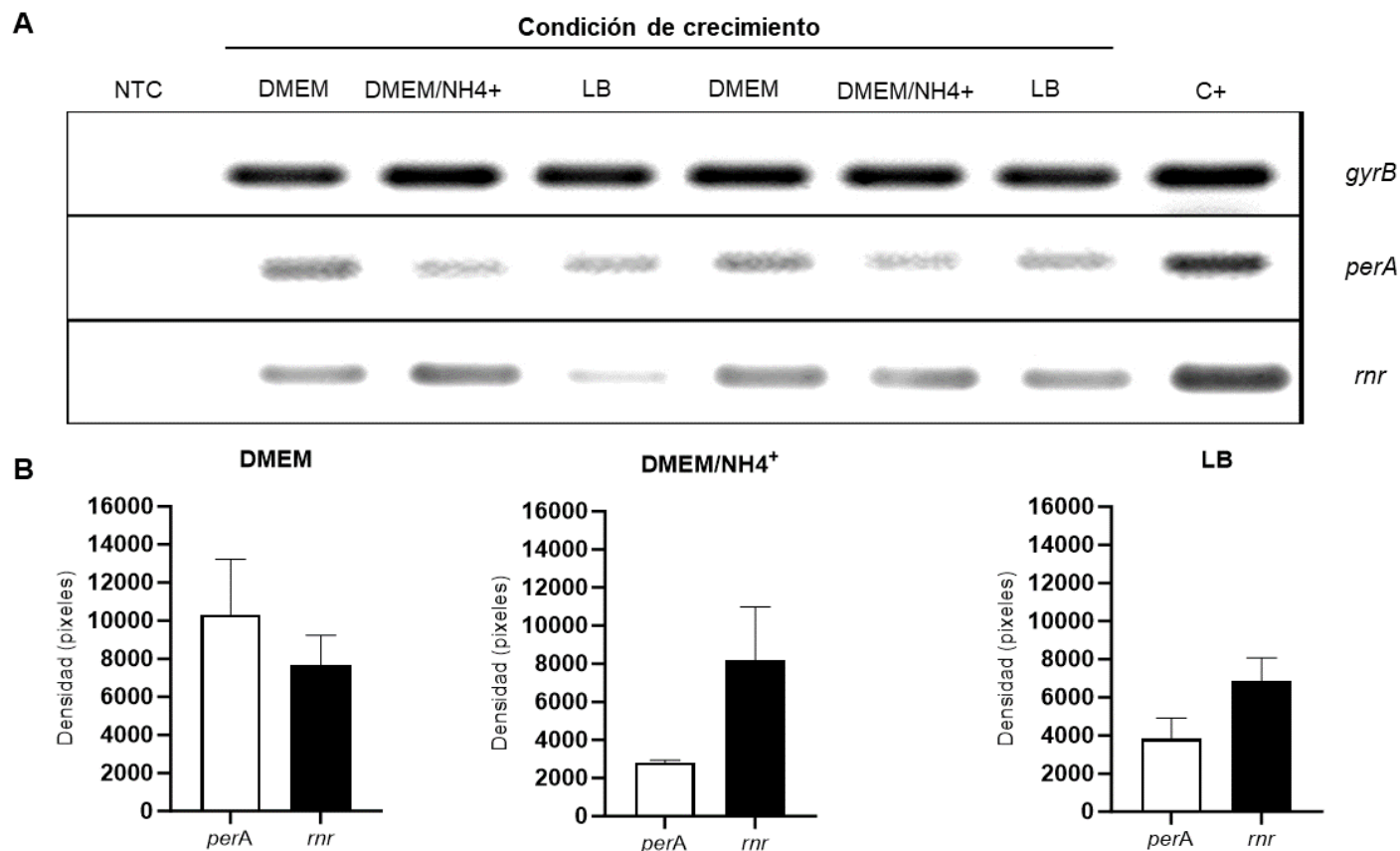


Figura 11. Expresión de *rnr* bajo diferentes condiciones de crecimiento en EPEC WT.

La cepa EPEC WT se cultivó en medio DMEM, DMEM/NH₄⁺ y LB a 37°C en agitación, se obtuvieron alícuotas de 20 ml de cada condición de crecimiento a DO₆₀₀ 0.8 y se procesaron para la extracción de RNA utilizado como plantilla para la síntesis de DNAc. **A)** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio de las RT-PCR punto final de la expresión de *gyrB*, *perA* y *rnr*. Carril 1: NTC, carriles 2-7: productos de RT-PCR punto final y carril 8: DNA genómico de cada gen analizado. **B)** Gráficas de la densitometría del análisis de las bandas de cada electroforesis, usando ImageJ. En el eje de las Y se ubica la densidad y en el eje de las X los genes evaluados. Los ensayos se realizaron por duplicado, las gráficas se elaboraron en GraphPad con sus respectivas desviaciones estándar.

Evaluación de la organización transcripcional de los genes *E2348C_2634*, *rnr* y *E2348C_2636*

Una vez analizada la expresión de *rnr* bajo diferentes condiciones de crecimiento se procedió a efectuar experimentos de RT-PCR punto final para determinar si los genes *E2348C_2634*, *rnr* y *E2348C_2636* se encuentran formando unidades transcripcionales independientes u operón, para esto, la cepa EPEC WT fue cultivada en DMEM/37°C y DMEM/NH₄⁺/37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ 0.8. Posteriormente, las muestras se recolectaron para la extracción de RNA y la síntesis de DNAc, las reacciones se realizaron por duplicado. Los productos de RT-PCR punto final se etiquetaron como a-f (Figura 12A y 13A).

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (los oligonucleótidos empleados para este análisis se describen en la tabla 3) (Figura 12B y 13B). De acuerdo con los resultados de RT-PCR punto final cuando EPEC WT es cultivada en medio DMEM se observan productos de la expresión de los genes como unidades transcripcionales independientes (Figura 12B: a-c) y una banda de 400 pb que corresponde al producto de *rnr-E2348C_2636* (Figura 12B: e), mientras que en el cultivo de EPEC en medio DMEM/NH₄⁺ se visualizan los productos como unidades transcripcionales independientes (Figura 13B: a-c), el producto de *rnr-E2348C_2636* (Figura 13B: e) y un producto de 874 pb que corresponde al tamaño de *E2348C_2634-rnr* (Figura 13B: d). Estos resultados indican que los genes *E2348C_2634-rnr* y *rnr-E2348C_2636* se transcriben como operones bicistrónicos.

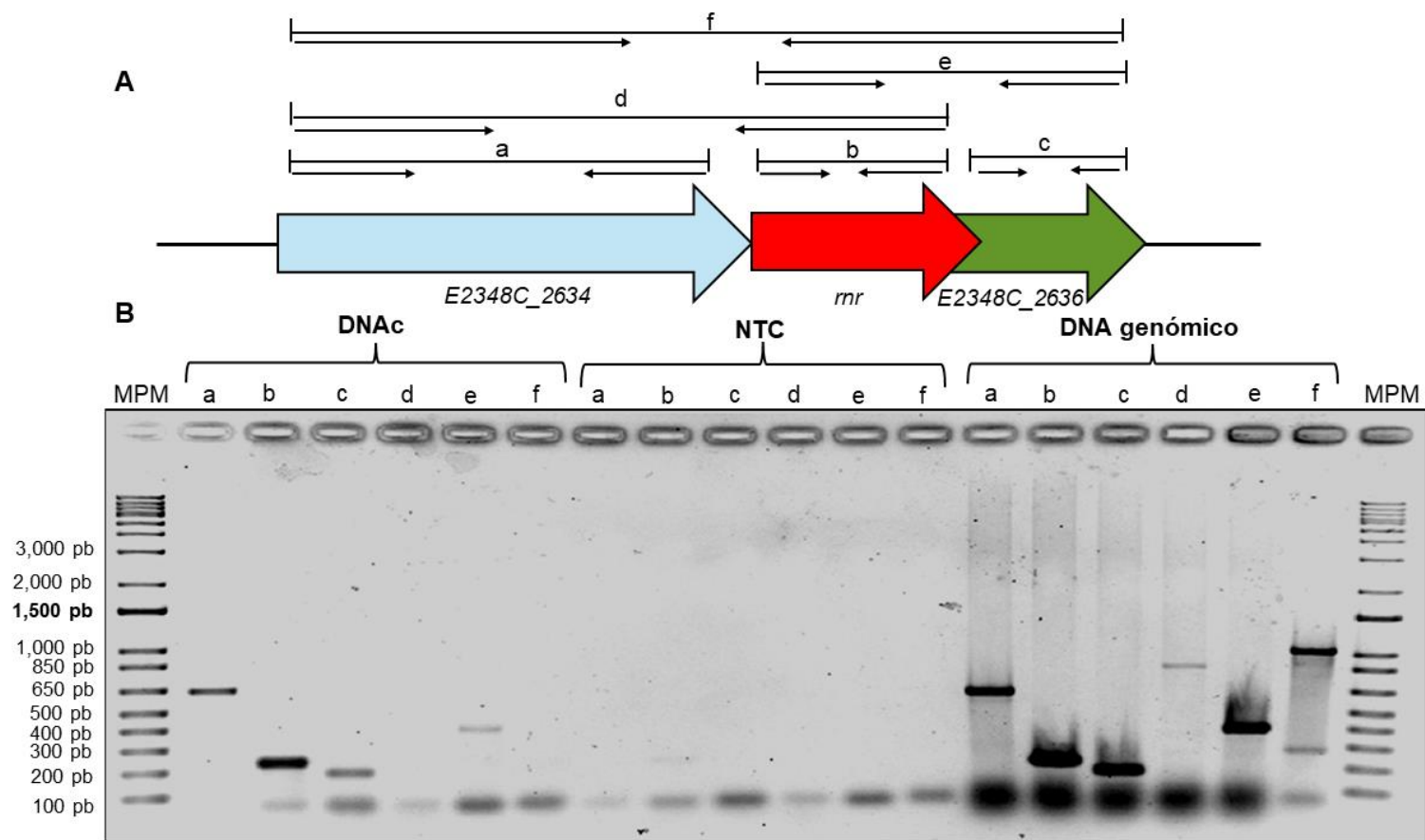


Figura 12. Expresión transcripcional de los genes *E2348C_2634*, *rnr* y *E2348C_2636* en DMEM.

A) Organización de los genes *E2348C_2634* (flecha azul), *rnr* (flecha roja) y *E2348C_2636* (flecha verde), los productos de amplificación de los genes se etiquetaron como a-f. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio de productos de RT-PCR punto final de la expresión de *E2348C_2634* (639 pb, a), *rnr* (228 pb, b) y *E2348C_2636* (186 pb, c) como unidades transcripcionales independientes y como operón *E2348C_2634-rnr* (874pb, d), *rnr-E2348C_2636* (400 pb, e) y *E2348C_2634-E2348C_2636* (1,046 pb, f). NTC y DNA genómico sirvieron como controles negativos y positivos, respectivamente. Los tamaños de los fragmentos del MPM (1 kb Plus, Thermo Scientific) se indican a la izquierda.

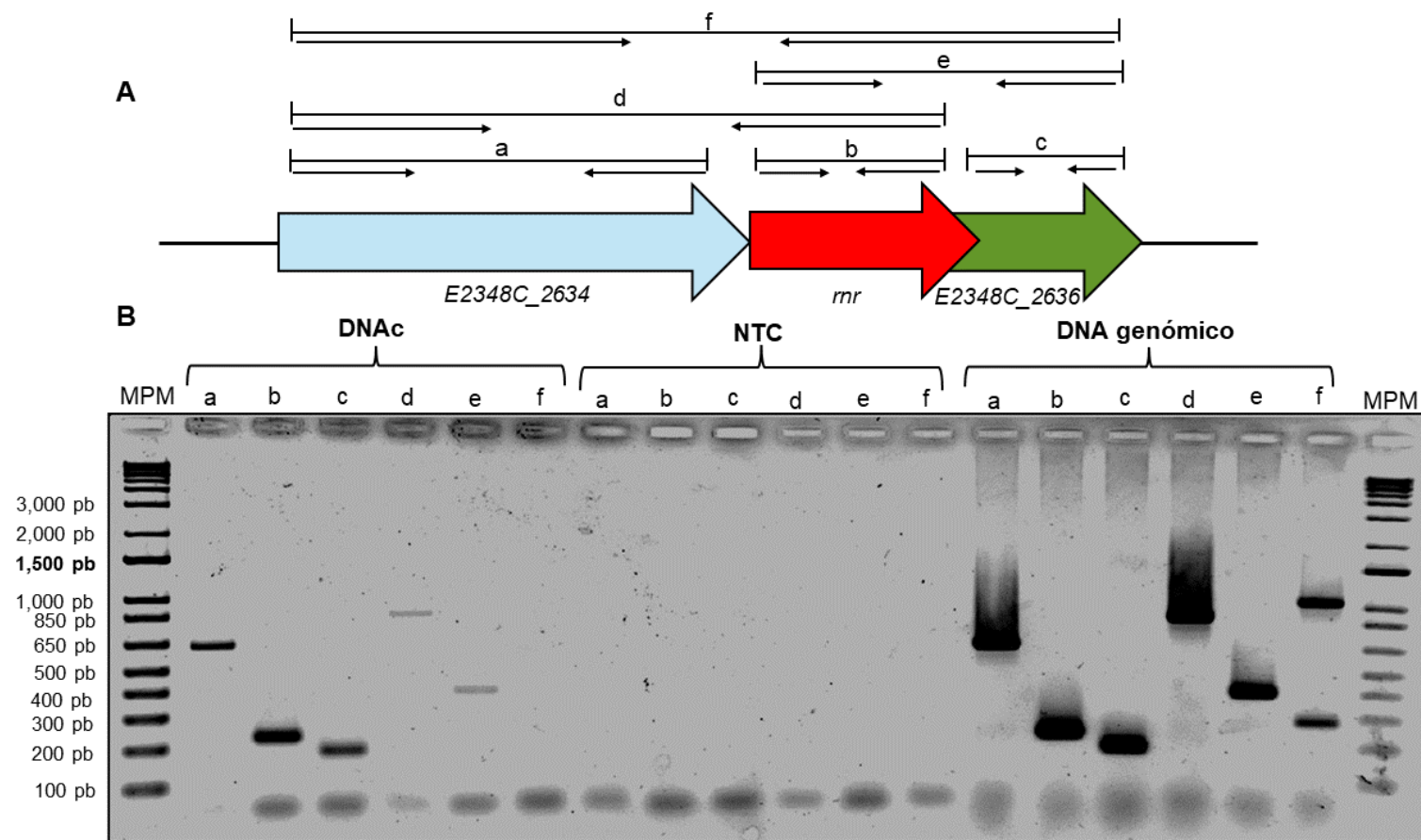


Figura 13. Expresión transcripcional de los genes *E2348C_2634*, *rnr* y *E2348C_2636* en DMEM/NH₄⁺.

A) Organización de los genes *E2348C_2634* (flecha azul), *rnr* (flecha roja) y *E2348C_2636* (flecha verde), los productos de amplificación de los genes se etiquetaron como a-f. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio de productos de RT-PCR punto final de la expresión de *E2348C_2634* (639 pb, a), *rnr* (228 pb, b) y *E2348C_2636* (186 pb, c) como unidades transcripcionales independientes y como operón *E2348C_2634-rnr* (874pb, d), *rnr-E2348C_2636* (400 pb, e) y *E2348C_2634-E2348C_2636* (1,046 pb, f). NTC y DNA genómico sirvieron como controles negativos y positivos, respectivamente. Los tamaños de los fragmentos del MPM (1 kb Plus, Thermo Scientific) se indican a la izquierda.

Discusión

La expresión de los genes de virulencia en los sistemas patógenos de muchas bacterias se encuentra bajo un mecanismo de estricta regulación que asegura la expresión diferencial de estos en respuesta al ambiente circundante óptimo en el que se encuentren coordinando con ello su activación en un nicho ecológico específico (Mellies *et al.*, 2007). En EPEC la acción cooperativa de reguladores globales como H-NS, IHF, FIS, BipA y QseA y de reguladores específicos como Ler, PerA y PerC expone una cascada reguladora compleja en la activación transcripcional de los genes de virulencia codificados en el plásmido pEAF y la isla LEE (Martínez-Laguna *et al.*, 1999; Mellies, *et al.*, 2007).

Los miembros de la familia AraC/XylS son proteínas que regulan tres funciones principales, el metabolismo del carbono, la respuesta al estrés ambiental y la virulencia en patógenos gram negativos como en patógenos gram positivos (Gallegos *et al.*, 1997). En nuestro modelo de estudio, PerA es la principal proteína de la familia AraC/XylS que armoniza los eventos moleculares que median la expresión de los genes de virulencia en EPEC, así como su autoactivación, asegurando con ello una activación rápida y eficaz de los genes que se encuentran bajo su regulación (Martínez-Laguna *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 2004). La regulación de PerA tiene una importante actuación en el mecanismo de patogenicidad en EPEC, su expresión está controlada por diversos reguladores, entre los que se encuentra Rnr miembro de la familia ANR que reprime la expresión de PerA por un mecanismo aún no identificado.

Rnr es una proteína soluble de 77 aminoácidos con masa molecular de 8.91 kDa, se encuentra codificada por el gen *rnr* ubicado en el cromosoma de EPEC con un tamaño de 234 pb, de acuerdo con la secuencia del DNA de EPEC (E2348/69) serotipo O127:H6 este gen está flanqueado río arriba por el gen *E2348C_2634* y río abajo por el gen *E2348C_2636* (Jaramillo, 2019), estos genes se localizan en la misma orientación que *rnr* por lo que es probable que se encuentren formado un operón. Con base a la organización y orientación de los genes *E2348C_2634*, *rnr* y *E2348C_2636* se procedió a realizar la búsqueda *in silico* de los posibles promotores río arriba de estos tres genes utilizando el programa BPRM. Los

resultados esquematizados en la figura 8 muestran la identificación de tres promotores río arriba de las secuencias de los genes analizados, la presencia de uno de estos promotores indica la posibilidad de que los genes *E2348C_2634*, *rnr* y *E2348C_2636* se encuentren integrando un operón (promotor ubicado con la caja -10 “score 48” en la posición -13 y la caja -35 “score 13” en la posición -33 respecto al ATG de *E2348C_2634*), este mismo promotor predicho propone que el gen *E2348C_2634* se transcribe como unidad transcripcional independiente. La identificación de dos promotores río arriba del gen *rnr* plantea la opción de que *rnr-E2348C_2636* formen un operón, si bien se encontraron dos promotores río arriba del gen *rnr* uno de estos se sitúa muy distante de su ATG (promotor con la caja -10 “score 35” en la posición -352 y la caja -35 “score 47” en la posición -369 respecto al ATG de *rnr*), de acuerdo con la información proporcionada por el programa bioinformático BPROM los promotores se localizan 150 pb río arriba de la secuencia del ORF analizado, lo anterior expone la posibilidad de que estos genes no estén formando unidades transcripcionales independientes.

En la secuencia río arriba de *E2348C_2634* se reconocieron sitios putativos de unión de factores de transcripción (Tabla 11), todos estos presentes en el genoma de EPEC.

Para identificar la organización genética conservada de los homólogos de *rnr* de la subfamilia SF1 seleccionamos y examinamos a *ECDEC8D_3471* de *E. coli* DEC8D y *rnr* de *C. rodentium* ICC168 y las comparamos con la organización genética de *E. coli* O127:H6, los resultados obtenidos exhiben cinco características conservadas entre *E. coli* O127:H6 y *C. rodentium* ICC168, estas características comprenden: dos proteínas de unión al DNA, una transposasa Mu, una ATPasa de la familia AAA, una proteína de la familia DUF2786 y una proteína de la familia DUF4752 (Figura 9, A y C). La disposición próxima de la transposasa Mu a *rnr* sugiere que este gen pudo haber sido adquirido por transferencia horizontal (Donnenberg, 2013). Por otra parte, la ATPasa de la familia AAA está integrada por proteínas que intervienen en importantes procesos celulares como la regulación del ciclo celular, la proteólisis y el desdoblamiento-plegamiento de proteínas, la biogénesis de organelos y el transporte celular; esta familia de ATPasas también

actúa como helicasa de DNA y como factores transcripcionales (Neuwald *et al.*, 1999; Ogura y Wilkinson, 2001; Olivares *et al.*, 2016). Por otro lado, la proteína de la familia DUF2786 y la proteína de la familia DUF4752 son dos proteínas con función desconocida.

Sumado a las características conservadas entre *E. coli* O127:H6 y *C. rodentium* ICC168 a través del análisis de las secuencias de DNA de estas bacterias se identificó que al igual que *rnr* de EPEC, *rnr* de *C. rodentium* ICC168 se encuentra flanqueado por dos genes que tienen su misma orientación con los cuales presumiblemente este formando un operón. En *C. rodentium* ICC168 *rnr* está flanqueado río arriba por *ROD_RS01485* que codifica un producto de 214 aminoácidos que pertenece a la familia DUF3164 familia de proteínas con función desconocida y río abajo por *ROD_RS25780* que codifica una proteína de 63 aminoácidos no caracterizada. Los resultados del alineamiento global por pares de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los genes que flanquean a *rnr* en EPEC y *C. rodentium* ICC168 mostraron que los genes *E2348C_2634* y *ROD_RS01485* comparten un 97.5% de similitud (Figura 18, anexos). El alineamiento de las secuencias nucleotídicas de *E2348C_2636* y *ROD_RS25780* presentó un 86.2% de similitud (Figura 19, anexos). Por otra parte, el alineamiento de las secuencias de las proteínas CAS10182.1 (codificada por *E2348C_2634*) y WP_000206136.1 (codificada por *ROD_RS01485*) encontró un 98.6% de identidad y un 99.1% de similitud entre estas (Figura 20, anexos). El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de CAS10184.1 (codificada por *E2348C_2636*) y WP_012904652.1 (codificada por *ROD_RS25780*) mostró un 82.5% de identidad y similitud (Figura 21, anexos). Lo anterior nos indica que los genes que flanquean a *rnr* en EPEC y en *C. rodentium* ICC168 tienen una relación evolutiva, es decir; provienen de un ancestro en común.

Respecto a la organización genética presente en *E. coli* DEC8D se identificó que esta bacteria tiene una proteína de unión al DNA y no dos de estas como en EPEC y *C. rodentium* ICC168, la única característica que comparte con *rnr* de EPEC es la localización de una proteína fágica río arriba de *ECDEC8D_3471*, la presencia de esta proteína fágica es un indicio de que los genes pudieron ser heredados por transferencia horizontal (Donnenberg, 2013).

Es de destacar que mientras se analizaba la organización genética de los homólogos de *rnr* de la subfamilia SF1 se reconoció que en EPEC (*E. coli* O127:H6) este regulador ANR forma parte de una inserción adquirida a través del profago *E2348C_PP_9*, esta inserción se ubica en el operón *eut* en donde se agrupan los genes que codifican para el metabolismo de la etanolamina (Eth), su localización precisa es entre los genes *eutB* y *eutC*, genes que codifican la etanolamina amoníaco liasa enzima que cataliza la hidrólisis de Eth en amoníaco y acetaldehído, como consecuencia de esta inserción EPEC no es capaz de metabolizar la Eth (Iguchi *et al.*, 2009), por el contrario, el operón *eut* en *E. coli* DEC8D y *C. rodentium* ICC168 está intacto lo que indica que en estas bacterias el operón *eut* es funcional (Rowley *et al.*, 2020) (Figura 9, A-C).

A 7,129 pb río arriba de *rnr* en EPEC en sentido contrario de su transcripción se ubica el gen *eutR* el cual codifica para la proteína EutR miembro de los reguladores transcripcionales AraC/XylS. En la familia *Enterobacteriaceae* la expresión del operón *eut* está regulada por EutR. En presencia de Eth y vitamina B12, EutR activa directamente la transcripción del operón *eut* (Luzader *et al.*, 2013). Sumado a esto, en EHEC (*E. coli* O157:H7) se ha identificado que EutR detecta la Eth presente en el intestino grueso para regular los genes de la isla LEE y promover la expresión de otros reguladores de virulencia (Ler, QseE y QseC), así como de la Stx, de las adhesinas fimbriales y de los flagelos. La regulación de EutR en EHEC sobre la isla LEE es a través de la activación de *ler*, EutR se une directamente al promotor de *ler* (caja -35 del promotor 2) incrementando la transcripción de *ler* y regulando indirectamente al alza a los genes de la isla LEE, proceso independiente del metabolismo de la Eth. EutR se expresa constitutivamente a niveles bajos a partir de su propio promotor expresión suficiente para la activación de *ler* (Kendall

et al., 2012; Luzader *et al.*, 2013; Gonyar y Kendall, 2014). En *C. rodentium* EutR detecta la Eth y activa la expresión de la isla LEE al unirse directamente al promotor de *ler*, de la misma manera que en EHEC (Rowley *et al.*, 2020). Lo anterior demuestra el papel conservado de la regulación dependiente de EutR sobre la expresión de los genes de la isla LEE y la coordinación del metabolismo de la Eth y la virulencia en respuesta a señales ambientales por parte de este regulador de la familia AraC/XylS.

Santiago y colaboradores proponen que los miembros de la familia ANR están codificados cerca y en dirección opuesta a la transcripción de la proteína AraC/XylS a la cual regula (Santiago *et al.*, 2014). En EPEC el miembro AraC/XylS más próximo a la ubicación de Rnr es EutR, y de acuerdo con el análisis de RNA-seq realizado por el grupo de investigación integrado por Rodríguez-Valverde y colaboradores, Rnr puede modular la expresión de múltiples reguladores AraC/XylS como PerA, EutR, GadX, MelR, AdiY, YdiP (Rodríguez-Valverde *et al.*, 2023). Lo anterior plantea la posibilidad de que Rnr y EutR forme un circuito regulador de retroalimentación que integre las condiciones ambientales en respuesta a las presiones selectivas durante la colonización de EPEC en el tracto intestinal, en donde EutR pueda no responder específicamente a la etanolamina y en cambio, reconocer señales adicionales que participen en la regulación de los genes de virulencia. Se necesitan realizar estudios para examinar si Rnr y EutR interactúan para regular los genes de virulencia de la isla LEE en EPEC.

Retomando los resultados obtenidos a través del análisis *in silico* en BPROM probamos las posibilidades en las que se pueden estar expresando los genes *E2348C_2634*, *rnr* y *E2348C_2636* como unidades transcripcionales independientes o como operones mediante RT-PCR punto final. Antes de realizar este análisis, se evaluaron las condiciones de crecimiento para corroborar la inducción de la expresión del gen *rnr* en medio DMEM, DMEM/NH₄⁺ y LB, los resultados obtenidos (Figura 11) muestran que *rnr* se expresa en las mismas condiciones que el gen *perA*, pero la mayor expresión de *rnr* se consigue cuando EPEC se cultiva en medio DMEM/NH₄⁺ (condición que reprime la expresión de los genes de virulencia) estos resultados coinciden con lo reportado por Jaramillo, 2019.

Posterior a la confirmación de la expresión del gen *rnr* bajo diferentes condiciones de crecimiento se seleccionó el cultivo de EPEC en DMEM y DMEM/NH₄⁺ para realizar RT-PCR punto final con la finalidad de evaluar si los otros dos genes analizados se expresan como unidades transcripcionales independientes u operón con *rnr* en las mismas condiciones que este último.

De acuerdo con los resultados de RT-PCR punto final cuando EPEC se cultiva en medio DMEM se identifica un producto de 400 pb que corresponde al tamaño de *rnr-E2348C_2636*, este mismo producto se visualiza cuando EPEC se cultiva en medio DMEM/NH₄⁺, adicionalmente en esta misma condición de crecimiento se obtuvo un producto de 874 pb que incluye a los genes *E2348C_2634-rnr*. Estos resultados indican que los genes *E2348C_2634-rnr* y *rnr-E2348C_2636* conforman operones bicistrónicos y que la expresión de *rnr-E2348C_2636* se obtiene en condiciones de inducción como en condiciones de represión de genes de virulencia, mientras que la expresión del operón *E2348C_2634-rnr* únicamente se genera en condición de represión de genes de virulencia (posiblemente la expresión de este operón bajo esta condición de crecimiento específica sea producto de que el gen *E2348C_2634* codifica para un transportador de sulfato y la adición de 20 mM de sulfato de amonio al medio DMEM sea un inductor en la transcripción de este primer gen que integra al operón bicistrónico *E2348C_2634-rnr*).

La figura 14 muestra la propuesta de un modelo sobre la cascada reguladora de EPEC mediada por Rnr que conduce al control de la expresión de genes de virulencia en la isla LEE y el pEAF tomando como base los resultados obtenidos en este estudio y en la bibliografía consultada en esta sección.

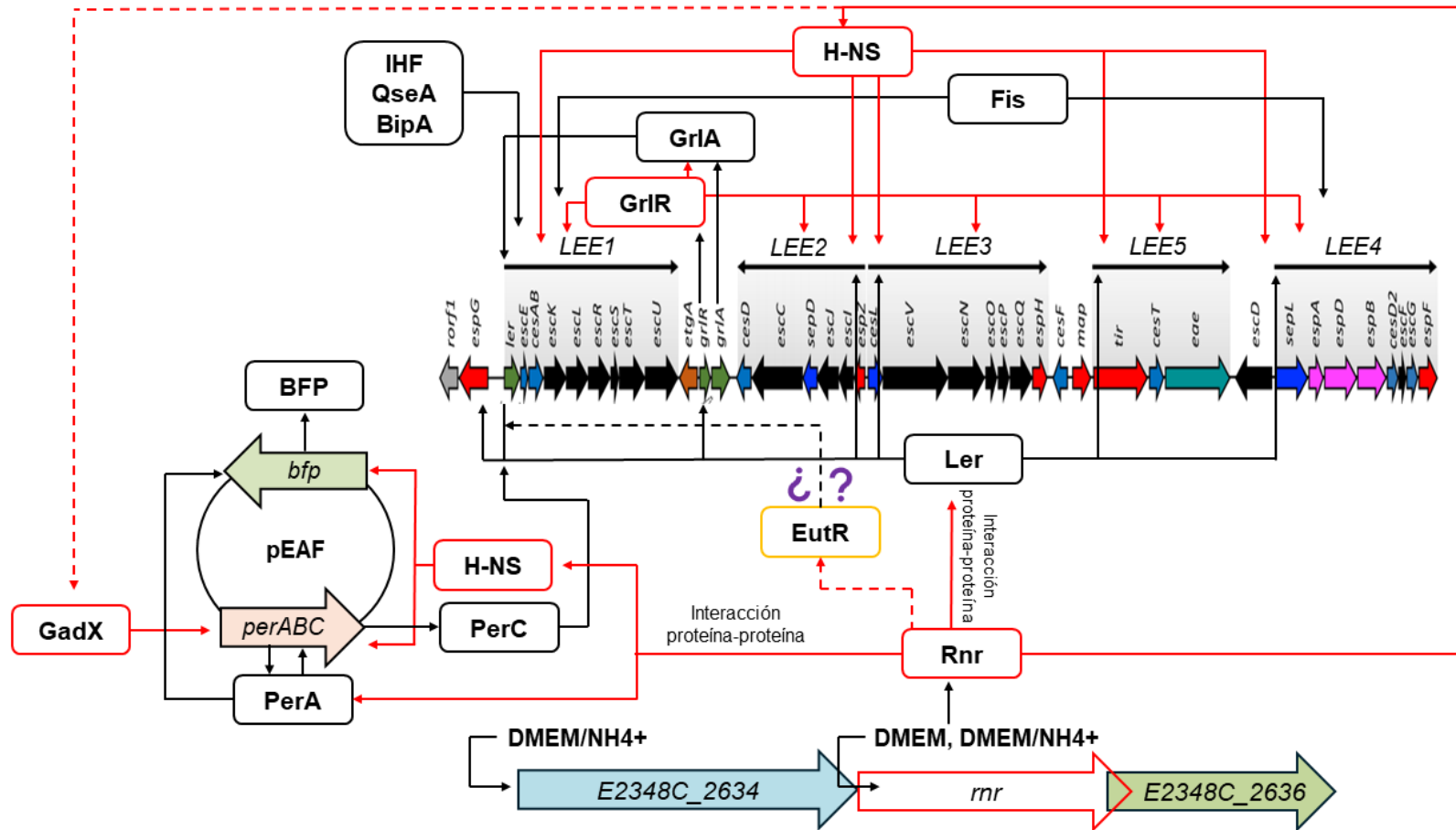


Figura 14. Modelo de la acción de Rnr en la regulación de los genes de virulencia en EPEC.

Las flechas negras indican regulación positiva y las flechas rojas continuas señalan represión. La flecha negra discontinua representa regulación positiva hipotética y las flechas rojas discontinuas muestran regulación negativa hipotética. Isla LEE imagen tomada de (Serapio-Palacios y Finlay, 2020).

Conclusiones

- *rnr* localizado en el cromosoma de EPEC está flanqueado río arriba por *E2348C_2634* y río abajo por *E2348C_2636*, en donde *E2348C_2634-rnr* y *rnr-E2348C_2636* estructuran operones bicistrónicos, los cuales se podrían transcribir a partir de dos promotores de los tres identificados en el análisis *in silico* de BPRM. La transcripción de estos operones bicistrónicos es dependiente de las condiciones de crecimiento, la condición de crecimiento que favorece la expresión del operón *E2348C_2634-rnr* es medio DMEM/NH₄⁺ a 37°C, mientras que las condiciones que favorecen la expresión del operón *rnr-E2348C_2636* son medio DMEM y DMEM/NH₄⁺ a 37°C.
- La organización genética de *rnr* de EPEC y *C. rodentium* ICC168 posee cinco características conservadas: dos proteínas de unión al DNA, una transposasa Mu y una ATPasa de la familia AAA ubicadas río arriba de *rnr*, una proteína de la familia DUF2786 y una proteína de la familia DUF4752 situadas río abajo del gen que codifica al regulador ANR.
- La organización y la orientación genética de *rnr* de *C. rodentium* ICC168 es similar a la observada en EPEC, en *C. rodentium* *rnr* está flanqueado río arriba por el gen *ROD_RS01485* que tiene un tamaño de 645 pb y río abajo por el gen *ROD_RS25780* con un tamaño de 192 pb. Esta organización y orientación propone la posibilidad de que estos tres genes podrían estar formando un operón.
- La inserción del profago *E2348C_PP_9* que contiene a *rnr* en el operón *eut* próximo a EutR (regulador AraC/XylS) plantea una interacción potencial entre Rnr y EutR para regular los genes de virulencia de la isla LEE independiente del metabolismo de la etanolamina.

Perspectivas

- Determinar la funcionalidad de los dos promotores localizados río arriba del operón *rnr-E2348C_2636* a través de fusiones transcripcionales.
- Identificar el sitio de inicio de la transcripción de los operones bicistrónicos *E2348C_2634-rnr* y *rnr-E2348C_2636* mediante la técnica de Primer Extension.
- Realizar ensayos de interacción proteína-proteína entre Rnr-EutR y otras proteínas reguladoras de virulencia de EPEC.

Bibliografía

Abe, H., Miyahara, A., Oshima, T., Tashiro, K., Ogura, Y., Kuhara, S., Ogasawara, N., Hayashi, T., y Tobe, T. (2008). Global Regulation by Horizontally Transferred Regulators Establishes the Pathogenicity of *Escherichia coli*. *DNA Research*, 15 (1), 25-38.

Alto, N.M., Weflen, A.W., Rardin, M.J., Yarar, D., Lazar, C.S., Tonikian, R., Koller, A., Taylor, S.S., Boone, C., Sidhu, S.S., Schmid, S.L., Hecht, G.A., y Dixon, J. E. (2007). The type III effector EspF coordinates membrane trafficking by the spatiotemporal activation of two eukaryotic signaling pathways. *JCB*, 178 (7), 1265-1278.

Barba, J., Bustamante, V.H., Flores-Valdez, M.A., Deng, W., Finlay, B.B., y Puente, J.L. (2005). A Positive Regulatory Loop Controls Expression of the Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Regulators Ler and GrlA. *J Bacteriol*, 187 (23), 7918-7930.

Baruch, K., Gur-Arie, L., Nadler, C., Koby, S., Yerushalmi, G., Ben-Neriah, Y., Yogev, O., Shaulian, E., Guttman, C., Zarivach, R., y Rosenshine, I. (2011). Metalloprotease type III effectors that specifically cleave JNK and NF- κ B. *EMBO J*, 30 (1), 221-231.

Bhatt, S., Romeo, T., y Kalman, D. (2011). Honing the message: posttranscriptional and posttranslational control in attaching and effacing pathogens. *Trends Microbiol*, 19 (5), 217-224.

Bustamante, V.H., Calva, E., y Puente, J.L. (1998). Analysis of cis-acting elements required for *bfpA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 180 (11), 3013-3016.

Bustamante, V.H., Santana, F.J., Calva, E., Puente, J.L. (2001). Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol*, 39 (3), 664-678.

Bustamante, V.H., Villalba, M.I., García-Angulo, V.A., Vázquez, A., Martínez, L.C., Jiménez, R., y Puente, J.L. (2011). PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*, 82 (2), 398-415.

Chen, H.D., y Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Review*, 29 (1), 83-98.

Clarke, S.C., Haigh, R.D., Freestone, P.P., y Williams, P.H. (2003). Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (3), 365-378.

Clements, A., Smollett, K., Lee, S.F., Hartland, E.L., Lowe, M., y Frankel, G. (2011). EspG of enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli* binds the Golgi matrix protein GM130 and disrupts the Golgi structure and function. *Cell Microbiol*, 13 (9), 1429-1439.

Creasey, E.A., Delahay, R.M., Bishop, A.A., Shaw, R.K., Kenny, B., Knutton, S., y Frankel, G. (2003). CesT is a bivalent enteropathogenic *Escherichia coli* chaperone required for translocation of both Tir and Map. *Mol. Microbiol*, 47 (1), 209-221.

Dahan, S., Wiles, S., La Ragione, R.M., Best, A., Woodward, M.J., Stevens, M.P., Shaw, R.K., Chong, Y., Knutton, S., Phillips, A., y Frankel, G. (2005). EspJ Is a Prophage-Carried Type III Effector Protein of Attaching and Effacing Pathogens That Modulates Infection Dynamics. *Infect. Immun*, 73 (2), 679-686.

Dean, P., y Kenny, B. (2004). Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and bacterial surface protein. *Mol. Microbiol*, 54 (3), 665-675.

Dean, P., Maresca, M., Schuller, S., Phillips, A.D., y Kenny, B. (2006). Potent diarrheagenic mechanism mediated by the cooperative action of three enteropathogenic *Escherichia coli*-injected effector proteins. *PNAS*, 103 (6), 1876-1881.

Dean, P., Scott, J.A., Knox, A.A., Quitard, S., Watkins, N.J., y Kenny, B. (2010). The Enteropathogenic *E. coli* Effector EspF Targets and Disrupts the Nucleolus by a Process Regulated by Mitochondrial Dysfunction. *PLoS Pathog*, 6 (6): e1000961.

Deng, W., Puente, J.L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B.A., Vázquez, A., Barba, J., Ibarra, J.A., O'Donnell, P., Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Goode,

D., Pawson, T., y Finlay, B.B. (2004). Dissecting virulence: systematic and functional analyses of pathogenicity island. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 101, 3597-3602.

Donnenberg, M.S, y Kaper, J. (1992), Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 60 (10), 3953-3961.

Donnenberg, M.S. (2013). *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of Pathogenesis (2^a ed). Elsevier.

Elliott, S.J., Wainwright, L.A., McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Deng, Y., Lai, L., McNamara, B.P., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B. (1998), The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/68. *Molecular Microbiology*, 28: 1-4.

Elliott, S.J., Sperandio, V., Girón, J.A., Shin, S., Mellies, J.L., Wainwright, L., Hutcheson, S.W., McDaniel., T.K., y Kaper, J.B. (2000). The Locus of Enterocyte Effacement (LEE)-Encoded Regulator Controls Expression of Both LEE- and Non-LEE-Encoded Virulence Factors in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 68 (11), 6115-6126.

Gallegos, M.T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., y Ramos, J.L. (1997). Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 61(4), 393-410.

Gao, X., Wan, F., Mateo, K., Callegari, E., Wang, D., Deng, W., Puente, J., Li, F., Chaussee, M.S., Finlay, B.B., Lenardo, M.J., y Hardwidge, P.R. (2009). Bacterial Effector Binding to Ribosomal Protein S3 Subverts NF- κ B Function. *PLoS Pathog*, 5 (12): e1000708.

Gomes, T.A.T, Vieira, M. A.M., Wachsmuth, I.K., Blake, P.A., y Trabulsi, L.R. (1989). Serotype-specific prevalence of *Escherichia coli* strains with EPEC adherence factor genes in infants with and without diarrhea in Sao Paulo, Brazil. *J Infect Dis*, 160 (1), 131-135.

Gomes, T. A.T., Elias, W., Scaletsky, I., Guth, B., Rodrigues, J., Piazza, R., Ferreira, L., y Martinez, M. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47S, 3-30.

Gómez-Duarte, P.G., y Kaper, J.B. (1995). A Plasmid-Encoded Regulatory Region Activates Chromosomal *eaeA* Expression in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun*, 63 (5), 1767-1776.

Gonyar, L.A., y Kendall, M.M. (2014). Ethanolamine and Choline Promote Expression of Putative and Characterized Fimbriae in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*, 82 (1), 193-201.

Guttman, J.A., Li, Y., Wickham, M.E., Deng, W., Vogl, A.W., y Finlay, B.B. (2006). Attaching and effacing pathogen-induced tight junction disruption *in vivo*. *Cell Microbiol*, 8 (4), 634-645.

Hemrajani, C., Berger, C.N., Robinson, K.S., Marchès, O., Mousnier, A., y Frankel, G. (2010). NleH Effectors interact with Bax Inhibitor-1 to block apoptosis during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *PNAS*, 107 (7), 3129-3134.

Holcrof, C.C., y Egan, S.M. (2000). Interdependence of Activation at *rhaSR* by Cyclic AMP Receptor Protein, the RNA Polymerase Alpha Subunit C-Terminal Domain, and RhaR. *J Bacteriol*, 182 (23), 6774-6782.

Ibarra, J.A., Villalba, M. I., y Puente, J.L. (2003). Identification of the DNA binding sites of PerA, the transcriptional activator of the *bfp* and *per* operons in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 185, 2835-2847.

Iguchi, A., Thomson, N.R., Ogura, Y., Saunders, D., Ooka, T., Henderson, I.R., Harris, D., Asadulghani, M., Kurokawa, K., Dean, P., Kenny, B., Quail, M.A., Thurston, S., Dougan, G., Hayashi, T., Parkhill, J., y Frankel, G. (2009). Complete Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of Enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 Strain E2348/69. *J Bacteriol*, 191 (1), 347-354.

Jaramillo, J.B. (2019). Efecto de un miembro de la familia ANR sobre la expression de genes de virulencia regulados por PerA en *E. coli* enteropatógena. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/4555>

Kam-Wing, J., Fawcett, W.P., Nobuyuku, F., Ishihama, A., y Wolf, R.E. (1996). Ambidextrous transcriptional activation by SoxS: requirement for the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit in a subset of *Escherichia coli* superoxide-inducible genes. *Mol Microbiol*, 19 (2), 307-317.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., y Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2: 123-140.

Kendall, M.M., Gruber, C.C., Parker, C.T., y Sperandio, V. (2012). Ethanolamine Controls Expression of Genes Encoding Components Involved in Interkingdom Signaling and Virulence in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *mBio*, 3 (3), 1-10.

Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A., Finlay, B.B. (1997). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells. *Cell*, 91 (4), 511-520.

Kenny, B. (1999). Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol. Microbiol*, 31 (4), 1229-1241.

Kenny, B., y Jepson, M. (2000). Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. *Cell Microbiol*, 2 (6), 579-590.

Kenny, B., Ellis, S., Leard, A.D., Warawa, J., Mellor, H., y Jepson, M.A. (2002). Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. *Mol. Microbiol*, 44 (4), 1095-1107.

Kim, J., Thanabalasuriar, A., Chaworth-Musters, T., Fromme, J.C., Frey, E.A., Lario, P.I., Metalnikov, P., Rizg, K., Thomas, N.A., Lee, S.F., Hartland, E.L., Hardwidge, P.R., Pawson, T., Strynadka, N.C., Finlay, B.B., Schekman, R., y Gruenheid, S. (2007). The Bacterial Virulence Factor NleA Inhibits Cellular Protein Secretion by Disrupting Mammalian COPII Function. *Cell Host Microbe*, 2 (3), 160-171.

Lanata, C.F., Fischer-Walker, C.L., Olascoaga, A.C., Torres, C.X., Aryee, M.J., y Black, R.E. (2013). Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS ONE*, 8 (9), 1-11.

Lara-Ochoa, C., González-Lara, F., Romero-González, L.E., Jaramillo-Rodríguez, J.B., Vázquez-Arellano, S.I., Medrano-López, A., Cedillo-Ramírez, L., Martínez-Laguna, Y., Girón, J.A., Pérez-Rueda, E., Puente, J.L., y Ibarra, J.A.

(2021). The transcriptional activator of the *bfp* operon in EPEC (PerA) interacts with the RNA polymerase alpha subunit. *Scientific Reports*, 11 (1): 8541.

Lara-Ochoa, C., Huerta-Saquero, A., Medrano-López, A., Deng, W., Finlay, B.B., Martínez-Laguna, Y., y Puente, J. L. (2023). GrIR, a negative regulator in enteropathogenic *E. coli*, also represses the expression of LEE virulence genes independently of its interaction with its cognate partner GrIA. *Front. Microbiol.* 14:1063368. doi: 10.3389/fmicb.2023.1063368

Luzader, D.H., Clark, D.E., Gonyar, L.A., y Kendall, M.M. (2013). EutR Is a Direct Regulator of Genes That Contribute to Metabolism and Virulence in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol*, 195 (21), 4947-4953.

Ma, C., Wickham, M.E., Guttman, J., et al. (2006). *Citrobacter rodentium* infection causes both mitochondrial dysfunction and intestinal epithelial barrier disruption in vivo: role of mitochondrial associated protein (Map). *Cell Microbiol*, 8 (10), 1669-1686.

Mahon, V., Smyth, C.J., y Smith, S.G. (2010). Mutagenesis of the Rns regulator of enterotoxigenic *Escherichia coli* reveals roles for a linker sequence and two helix-turn-helix motifs. *Microbiology*, 156 (9), 2796-2806.

Marchès, O., Nougayrede, J. P., Boullier, S., Mainil, J., Charlier, G., Raymond, I., Pohl. P., Boury, M., De Rycke, J., Milon, A., y Oswald, E. (2000). Role of Tir and Intimin in the Virulence of Rabbit Enteropathogenic *Escherichia coli* Serotype O103:H2. *Infect. Immun*, 68 (4), 2171-2182.

Marchès, O., Covarelli, V., Dahan, S., Cougoule, C., Bhatta, P., Frankel, G., y Caron, E. (2008). EspJ of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsono-phagocytosis. *Cell Microbiol*, 10 (5), 1104-1115.

Mare, A.D., Ciurea, C.N., Man, A., Tudor, B., Moldovan, V., Decean, L., y Toma, F. (2021). Enteropathogenic *Escherichia coli*-A Summary of the Literature. *Gastroenterol. Insights*, 12, 28-40.

Martin, R.G., y Rosner, J.L. (2001). The AraC transcriptional activators. *Curr Opin Microbiol*, 4 (2), 132-137.

Martínez-Laguna, Y., Calva, E., y Puente, J.L. (1999). Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*, 33, 153-166.

Matsuzawa, T., Kuwae, A., y Abe, A. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli* Type III Effectors EspG and EspG2 Alter Epithelial Paracellular Permeability. *Infect. Immun*, 73 (10), 6283-6289.

Mellies, J.L., Elliott, S.J., Sperandio, V., Donnenberg, M.S., y Kaper, J.B. (1999). The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol. Microbiol*, 33 (2), 296-306.

Mellies, J.L., Barron, A.M.S., y Carmona, A.M. (2007). Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence Gene Regulation. *Infection and Immunity*, 75 (9), 4199-4210.

Mickey, A.S., y Nataro, J.P. (2020). Dual Function of Aar, a Member of the New AraC Negative Regulator Family, in *Escherichia coli* Gene Expression. *Infect Immun*, 88 (6), 1-12.

Mora, A. (2022). Papel de la proteína ANREP sobre la función de PerA en *Escherichia coli* enteropatógena. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/16273>

Morin, N., Tirling, C., Ivison, S.M., Kaur, A.P., Nataro, J.P., y Steiner, T.S. (2010). Autoactivation of the AggR regulator of enteroaggregative *Escherichia coli* *in vitro* and *in vivo*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 58 (3), 344-355.

Morin, N., Santiago, A.E., Ernst, R.K., Guillot, S.J., y Nataro, J.P. (2013). Characterization of the AggR Regulon in Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 81 (1), 122-132.

Munson, G.P., y Scott, J.R. (2000). Rns, a virulence regulator within the AraC family, requires binding sites upstream and downstream of its own promoter to function as an activator. *Mol. Microbiol*, 36 (6), 1391-1402.

Munson, G.P., Holcomb, L.G., y Scott, J.R. (2001). Novel group of virulence activators within the AraC family that are not restricted to upstream binding sites. *Infect. Immun*, 69 (1), 186-193.

Nadler, C., Baruch, K., Kobi, S., Mills, E., Haviv, G., Farago, M., Alkalay, I., Bartfeld, S., Meyer, T.F., Ben-Neriah, Y., y Rosenshine, I. (2010). The Type III Secretion Effector NleE Inhibits NF- κ B Activation. *PLoS Pathog*, 6 (1): e1000743.

Nagai, T., Abe, A., y Sasakawa, C. (2005). Targeting of Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to Host Mitochondria Is Essential for Bacterial Pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF. *J. Biol. Chem*, 280 (4), 2998-3011.

Nataro, J. P., y Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11 (1), 142-201.

Navarro-García, F., Canizalez-Roman, A., Sui, B.Q., Nataro, J.P., y Azamar, Y. (2004). The Serine Protease Motif of EspC from Enteropathogenic *Escherichia coli* Produces Epithelial Damage by a Mechanism Different from That of Pet Toxin from Enterocagregative *E. coli*. *Infec. Immun*, 72 (6), 3609-3621.

Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., y Koonin, E.V. (1999). AAA⁺: A Class of Chaperone-Like ATPases Associated with the Assembly, Operation, and Disassembly of Protein Complexes. *Genome Res*, 9 (1), 27-43.

Newton, H.J., Pearson, J.S., Badea, L., Kelly, M., Lucas, M., Holloway, G., Wagstaff, K.M., Dunstone, M.A., Sloan, J., Whisstock, J.C., Kaper, J.B., Robins-Browne, R.M., Jans, D.A., Frankel, G., Phillips, A.D., Coulson, B.S., y Hartland, E.L. (2010). The Type III Effectors NleE and NleB from Enteropathogenic *E. coli* and OspZ from *Shigella* Block Nuclear Translocation of NF- κ B p65. *PLoS Pathog*, 6 (5): e1000898.

Ogura, T., y Wilkinson, A.J. (2001). AAA⁺ superfamily ATPases: Common structure-diverse function. *Genes Cells*, 6 (7), 575-597.

Olivares, A.O., Baker, T.A., y Sauer, R.T. (2016). Mechanistic insights into bacterial AAA⁺ proteases and protein-remodelling machines. *Nat Rev Microbiol*, 14 (1), 33-44.

Parra, M.C., y Collins, C.M. (2012). Mutational analysis of the N-terminal domain of UreR, the positive transcriptional regulator of urease gene expression. *Microbiol Res*, 167 (7), 433-444.

Pearson, J.S., Giogha, C., Wong Fok Lung, T., y Hartland, E.L. (2016). The genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. *Annu. Rev. Genet*, 50 (1), 493-513.

Peralta-Ramírez, J., Hernandez, J. M., Manning-Cela, R., Luna-Muñoz, J., Garcia-Tovar, C., Nougayréde, J., Oswald, E., y Navarro-Garcia, F. (2008). EspF Interacts with Nucleation-Promoting Factors To Recruit Junctional Proteins into Pedestals for Pedestal Maturation and Disruption of Paracellular Permeability. *Infect. Immun*, 76 (9), 3854-3868.

Pham, T.H., Gao, X., Tsai, K., Olsen, R., Wan, F., y Hardwidge, P.R. (2012). Functional Differences and Interactions between the *Escherichia coli* Type III Secretion System Effectors NleH1 and NleH2. *Infect. Immun*, 80 (6), 2133-2140.

Porter, M.E., Mitchell, P., Roe, A.J., Free, A., Smith, D.G.E., y Gally, D.L. (2004). Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, Per A from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*, 54 (4), 1117-1133.

Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W., y Schoolnik, G. K., (1996). The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol*, 20 (1), 87-100.

Raymond, B., Young, J.C., Pallett, M., Endres, R.G., Clements, A., y Frankel, G. (2013). Subversion of trafficking, apoptosis, and innate immunity by type III secretion system effectors. *Trends Microbiol*, 21 (8), 430-441.

Rhee, S., Martin, R.G., Rosner, J.L., y Davies, D.R. (1998). A novel DNA-binding motif in MarA: The First structure for an AraC family transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 (18), 10413-10418.

Ritchie, J.M., Thorpe, C.M., Rogers, A. B., y Waldor, M.K. (2003). Critical Roles for *stx*₂, *eae*, and *tir* in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*-Induced Diarrhea and Intestinal Inflammation in Infant Rabbits. *Infect. Immun*, 71 (12), 7129-7139.

Rodriguez-Valverde, D., Giron, J.A., Hu, Y., Nataro, J.P., Ruiz-Perez, F., y Santiago, A.E. (2023). Highly-conserved regulatory activity of the ANR family in the virulence of diarrheagenic bacteria through interaction with master and global regulators. *Sci Rep*, 13 (1),1-17.

Rowley, C.A., Sauder, A.B., y Kendall, M.M. (2020). The Ethanolamine-Sensing Transcription Factor EutR Promotes Virulence and Transmission during *Citrobacter rodentium* Intestinal Infection. *Infect Immun*, 88 (9), 1-10.

Roxas, J.L., Wilbur, J.S., Zhang, X., Martines, G., Vedantam, G., y Viswanathan, V.K. (2012). The Enteropathogenic *Escherichia coli*-Secreted Protein EspZ Inhibits Host Cell Apoptosis. *Infect Immun*, 80 (11), 3850-3857.

Ruíz, R., Marqués, S., y Ramos, J.L. (2003). Leucines 193 and 194 at the N-terminal domain of the XylS proteins, the positive transcriptional regulator of the TOL meta-cleavage pathway, are involved in dimerization. *J Bacteriol*, 185 (10), 3036-3041.

Ruiz, R., Ramos, J.L., y Egan, S.M. (2001). Interactions of the XylS regulators with the C-terminal domain of the RNA polymerase α subunit influence the expression level from the cognate Pm promotor. *FEBS Lett*, 491 (3), 207-211.

Ruiz, R., y Ramos, J.L. (2001). Residues 137 and 153 of XylS Influence Contacts with the C-Terminal Domain of the RNA Polymerase α Subunit. *Biochem Biophys Res Commun*, 287 (2), 519-521.

Saldaña, Z., Erdem, A., Schüller, S., Okeke, I., Lucas, M., Sivananthan, A., Phillips, A., y Kaper, J. B. (2009). The *Escherichia coli* Common Pilus and the Bundle-Forming Pilus Act in Concert during the Formation of Localized Adherence by Enteropathogenic *E. coli*. *Journal of Bacteriology*, 191 (11), 3451-3461.

Samba-Louaka, A., Nougayrède, J.P., Watrin, C., Oswald, E., y Taieb, F. (2009). The Enteropathogenic *Escherichia coli* Effector Cif Induces Delayed Apoptosis in Epithelial cells. *Infect. Immun*, 77 (12), 5471-5477.

Santiago, A.E., Ruiz-Perez, F., Jo, N.Y., Vijayakumar, V., Gong, M.Q., y Nataro, J.P. (2014). A Large Family of Antivirulence Regulators Modulates the Effects of Transcriptional Activators in Gram-negative Pathogenic Bacteria. *PLoS Pathog*, 10 (5), 1-15.

Santiago, A.E., Yan, M.B., Tran, M., Wright, N., Luzader, D.H., Kendall, M.M., Ruiz-Perez, F., y Nataro, J.P. (2016). A large family of anti-activators accompanying XylS/AraC family regulatory proteins. *Molecular Microbiology*, 101 (2), 314-332.

Santiago, A.E., Yan, M.B., Hazen, T.H., Sauder, B., Meza-Segura, M., Rasko, D.A., Kendall, M.M., Ruiz-Perez, F., y Nataro, J.P. (2017). The AraC Negative Regulator family modulates the activity of histones-like proteins in pathogenic bacteria. *PLoS Pathog*, 13 (8), 1-25.

Santos, A., y Finlay, B.B. (2015). Bringing down the host: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* effector-mediated subversion of host innate immune pathways. *Cell Microbiol*, 17 (3), 318-332.

Selyunin, A.S., y Alto, N.M. (2011). Activation of PAK by a bacterial type effector EspG reveals alternative mechanisms of GTPase pathway regulation. *SmallGTPase*, 2 (4), 217-221.

Serapio-Palacios, A., y Finlay, B.B. (2020). Dynamics of expression, secretion and translocation of type III effectors during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Curr. Opin. Microbiol*, 54, 67-76.

Sham, H.P., Shames, S.R., Croxen, M. A., Ma, C., Chan, J.M., Khan, M.A., Wickham, M.E., Deng, W., Finlay, B.B., y Vallance, B.A. (2011). Attaching and Effacing Bacterial Effector NleC Suppresses Epithelial Inflammatory Responses by Inhibiting NF- κ B and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *Infect. Immun*, 79 (9), 3552-3562.

Shaw, R.K., Smollett, K., Cleary, J., Garmendia, J., Straatman-Iwanowska, A., Frankel, G., y Knutton, S. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli* Type III Effectors EspG and EspG2 Disrupt the Microtubule Network of Intestinal Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 73 (7), 4385-4390.

Shin, S., Castanie-Cornet, M., Foster, J.W., Crawford, J.A., Brinkley, C., y Kaper, J.B. (2001). An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. *Mol. Microbiol*, 41 (5), 1133-1150.

Slater, S.L., S agfors, A.M., Pollard, D.J., Ruano-Gallego, D., y Frankel, G. (2018). The Type III Secretion System of Pathogenic *Escherichia coli*. Frankel, G., y Ron, E. (Eds) *Escherichia coli*, a Versatile Pathogen (51-72). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/82_2018_116

Solovyev, V., y Salamov, A. (2011). Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*. Nova Science Publishers, 61-78.

Tahoun, A., Siszler, G., Spears, K., Spears, K., McAteer, S., Tree, J., Paxton, E., Gillespie, T.L., Martinez-Argudo, I., Jepson, M.A., Shaw, D.J., Koegl, M., Haas, J., Gally, D.L., y Mahajan, A. (2011). Comparative Analysis of EspF Variants in Inhibition of *Escherichia coli* Phagocytosis by Macrophages and Inhibition of E. coli Translocation through Human-and Bovine-Derived M Cells. *Infect. Immun*, 79 (11), 4716-4729.

Taieb, F., Nougayrède, J. P., Watrin, C., Samba-Louaka, A., y Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* cyclomodulin Cif induces G₂ arrest of the host cell cycle without activation of the DNA-damage checkpoint-signalling pathway. *Cell Microbiol*, 8 (12), 1910-1921.

Thanabalasuriar, A., Bergeron, J., Gillingham, A., Mimee, M., Thomassin, J., Strynadka, N., Kim, J., y Gruenheid, S. (2012). Sec24 interaction is essential for localization and virulence-associated function of the bacterial effector protein NleA. *Cell Microbiol*, 14 (8), 1206-1218.

Tobe, T., Schoolnik, G.K., Sohel, I., Bustamante, V.H., y Puente, J.L. (1996). Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*, 21 (5), 963-975.

Tomson, F.L., Viswanathan, V.K., Kanack, K.J., Kanteti, R.P., Straub, K.V., Menet, M., Kaper, J.B., Hecht, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli* EspG disrupts microtubules and in conjunction with Orf3 enhances perturbation of the tight junction barrier. *Mol. Microbiol*, 56 (2), 447-464.

Tu, X., Nisan, I., Yona, C., Hanski, E., y Rosenshine, I. (2003). EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 47 (3), 595-606.

United Nations International Children´s Emergency Fund [UNICEF]. (2021). Diarrhoea Remains a Leading Killer of Young Children, Despite the Availability of

Simple Treatment Solution. Recuperado de <https://data.unicef.org/topic/child-health/diarrhoeal-disease/>

Vallance, B. A., y Finlay, B.B. (2000). Exploitation of host cell by enteropathogenic *Escherichia coli*. *PNAS*, 97 (16), 8799-8806.

Vossenkämper, A., MacDonald, T.T., y Marchés, O. (2011). Always one step ahead: how pathogenic bacteria use the type III secretion system to manipulate the intestinal mucosal immune system. *J. Inflamm*, 8 (11), 1-10.

Vossenkämper, A., Marches, O., Fairclough, P.D., Warnes, G., Stagg, A.J., Lindsay, J.O., Evans, P.C., Luong, L.A., Croft, N.M., Naik, S., Frankel, G., y MacDonald, T.T. (2010). Inhibition of NF- κ B Signaling in Human Dendritic Cells by the Enteropathogenic *Escherichia coli* Effector Protein NleE. *J. Immunol*, 185 (7), 4118-4127.

Wong, A.R.C., Pearson, J.S., Bright, M.D., Munera, D., Robinson, K.S., Lee, S.F., Frankel, G., y Hartland, E.L. (2011). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Molecular Microbiology*, 80 (6), 1420-1438.

Wong, A.R., Clements, A., Raymond, B., Crepin, V.F., y Frankel, G. (2012). The Interplay between the *Escherichia coli* Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor Effectors and the Mammalian RhoGEF Inhibitor EspH. *mBio*, 3 (1): e00250-11.

World Health Organization [WHO]. (2017). Diarrhoeal disease. Recuperado de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>

Yen, H., Ooka, T., Iguchi, A., Hayashi, T., Sugimoto, N., y Tobe, T. (2010). NleC, a Type III Secretion Protease, Compromises NF- κ B Activation by Targeting p65/RelA. *PLoS Pathog*, 6 (12): e1001231.

Anexos

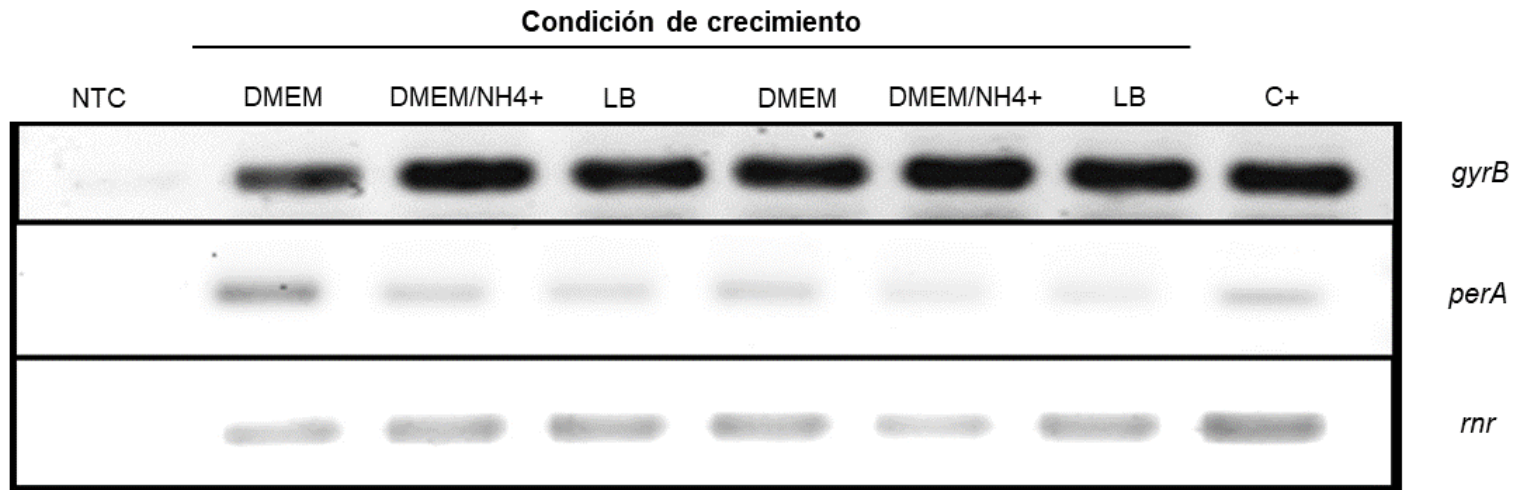


Figura 15. Expresión de *rnr* bajo diferentes condiciones de crecimiento en EPEC WT (repetición).

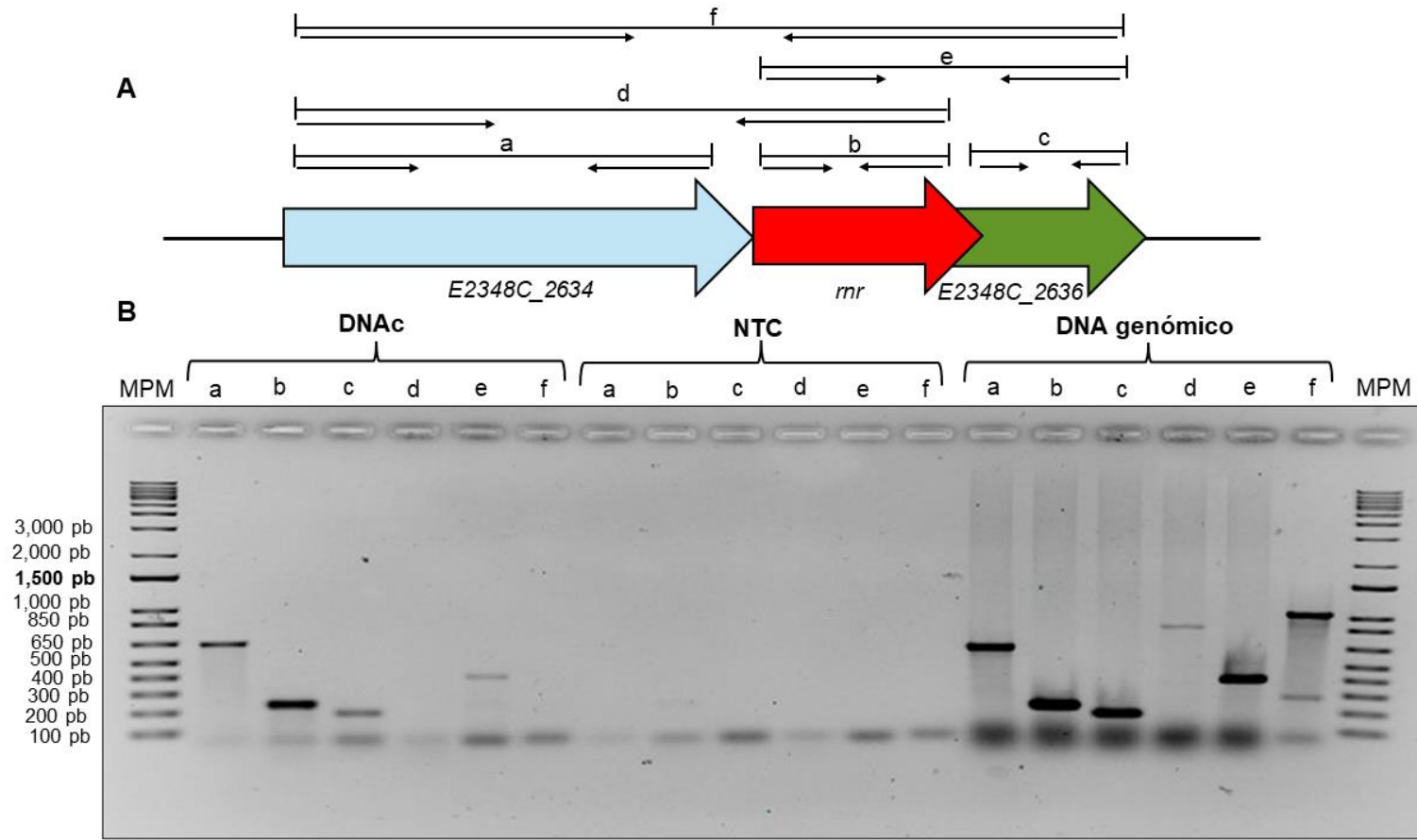


Figura 16. Expresión transcripcional de los genes *E2348C_2634*, *mr* y *E2348C_2636* en DMEM (repetición).

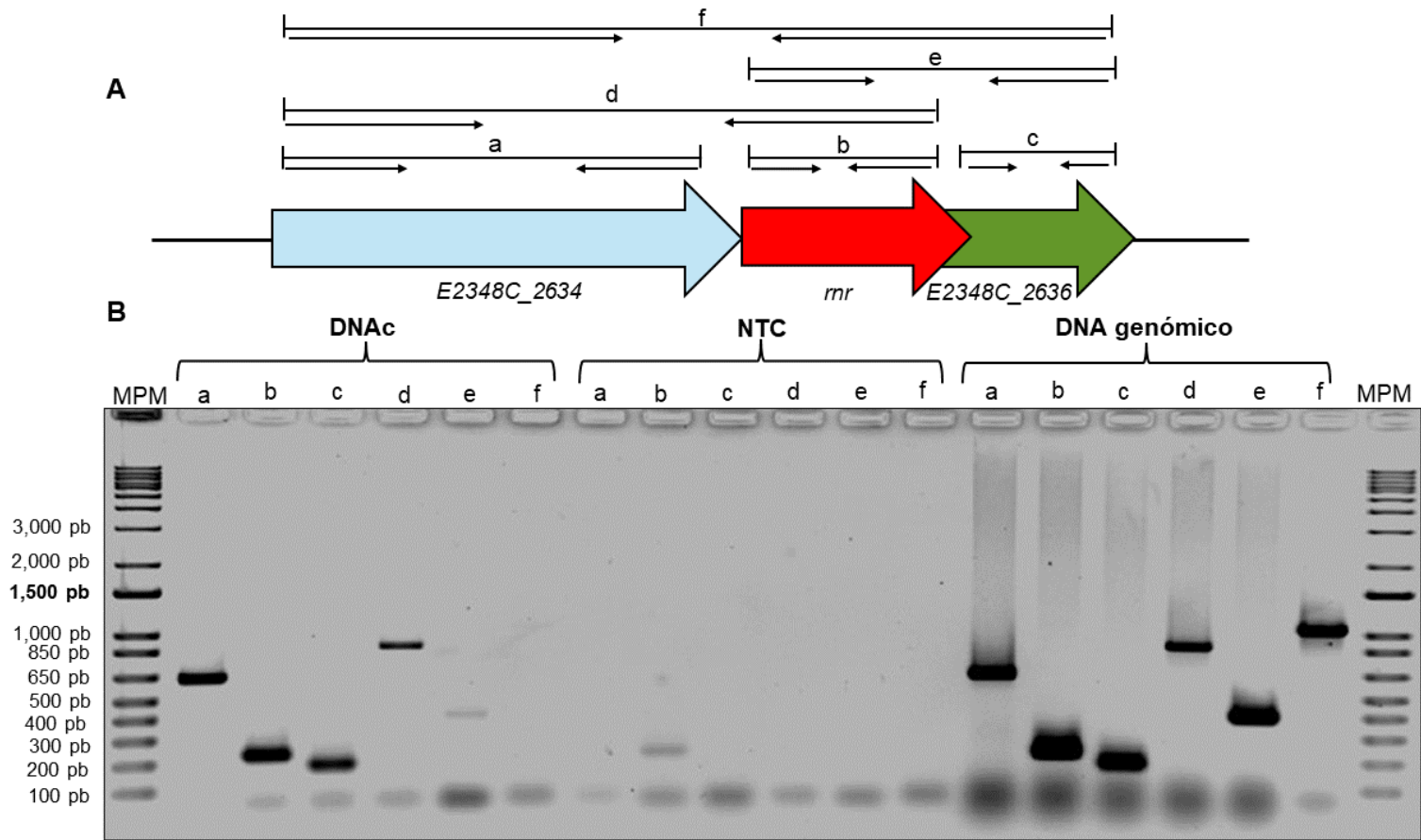


Figura 17. Expresión transcripcional de los genes *E2348C_2634*, *rnr* y *E2348C_2636* en DMEM/NH₄⁺ (repetición).

Tabla 12

Promedio de densidad normalizada de *perA* y *rnr* en medio DMEM.

	Densidad normalizada en medio DMEM			Promedio
<i>perA</i>	11,366.68	6,981.17	12,549.95	10,299.27
<i>rnr</i>	7,814.17	9,162.41	6,073.04	7,683.21

Tabla 13

Promedio de densidad normalizada de *perA* y *rnr* en medio DMEM/NH₄⁺.

	Densidad normalizada en medio DMEM/NH ₄ ⁺			Promedio
<i>perA</i>	2,721.15	2,765.17	2,958.48	2,814.93
<i>rnr</i>	10,751.69	8,638.94	5,201.74	8,197.46

Tabla 14

Promedio de densidad normalizada de *perA* y *rnr* en medio LB.

	Densidad normalizada en medio LB			Promedio
<i>perA</i>	4,058.45	4,784.84	2,648.24	3,830.51
<i>rnr</i>	8,247.94	6,056.21	6,357.55	6,887.23

<i>E2348C_2634</i>	1	ATGACGACTGAAAATAAAGTTAAGCAATACACGAAACTCAAGCGCCTGA	50
<i>ROD_RS01485</i>	1	ATGACGACTGAAAATAAAGTTAAGCAATACACGAAACTCAAGCGCCTGA	50
<i>E2348C_2634</i>	51	AGGTTACTGGGTGGATGCCCGTGGCGTAATGACACCTGAAAGCCTTATCA	100
<i>ROD_RS01485</i>	51	AGGTTACTGGGTGGATGCCCGTGGCGTAATGACACCTGAAAGCCTTATCA	100
<i>E2348C_2634</i>	101	AAGATATTGACCGCGACC GCGAGCAGCTGGTCGGTGAGCTTGTGGAGATG	150
<i>ROD_RS01485</i>	101	AAGATATTGACCGCGACC GCGAGCAGCTGGTCGGTGAGCTTGTGGAGATG	150
<i>E2348C_2634</i>	151	GTGATTGCTGCCTCCGCCTCACTGCGGGAAC TGAAC TGCCTGCGTTTG	200
<i>ROD_RS01485</i>	151	GTGATTGCTGCCTCCGCCTCACTGCGGGAAC TGAAC TGCCTGCGTTTG	200
<i>E2348C_2634</i>	201	TGATATTCAGGCGTTTATTGACCTGTCGGCGGAGAAAATACGGCGCTGTGA	250
<i>ROD_RS01485</i>	201	TGATATTCAGGCGTTTATTGACCTGTCGGCGGAGAAAATACGGCGCTGTGA	250
<i>E2348C_2634</i>	251	AAGGCGGTAAAAAGGGAATATCACGCTTTACAGCTTTGACGGGCGTTAC	300
<i>ROD_RS01485</i>	251	AAGGCGGTAAAAAGGGAATATCACGCTTTACAGCTTTGACGGGCGTTAC	300
<i>E2348C_2634</i>	301	AAGATTCAGCGGCCATGCAGGACCGTATCGCGTTTGATGAACGCATTCA	350
<i>ROD_RS01485</i>	301	AAGATTCAGCGGCCATGCAGGACCGTATCGCGTTTGATGAACGCATTCA	350
<i>E2348C_2634</i>	351	GACCGGAAGTCGCTGATTGATGATTGCCTGGCTGACTGGACGGAAGATG	400
<i>ROD_RS01485</i>	351	GACCGGAAGTCGCTGATTGATGATTGCCTGGCTGACTGGACGGAAGATG	400
<i>E2348C_2634</i>	401	CACGCCCTGAAATTAAGGCCATCATCAGTGAGGCATTAGCACGGACAAG	450
<i>ROD_RS01485</i>	401	CGCGCCCTGAAATAAAGCCATCATCAGCGAGGCATTAGCACGGACAAG	450
<i>E2348C_2634</i>	451	GAAGGCAACATCAACACCGGTTCGCGTCTGGCCCTGCGTCGCCTCGAGAT	500
<i>ROD_RS01485</i>	451	GAAGGCAACATTAATACCGGGCGGTTCTGGCCCTGCGTCGCCTCGAAAT	500
<i>E2348C_2634</i>	501	TGAGGACGAACGCTGGAATAACGCCATGTCGCTGATTGGTGAAGCCGTCC	550
<i>ROD_RS01485</i>	501	TGAGGACGAACGCTGGAATAACGCCATGACGCTGATTGGCGAAGCCGTCC	550
<i>E2348C_2634</i>	551	AGGTAAATGGCAGCAAAAAGCTATATCCGCGTGATGAGCGCGTCGGTGAT	600
<i>ROD_RS01485</i>	551	AGGTGATTGGCAGCAAAAAGCTATATCCGCGTGATGAGCGCGTCGGTGAT	600
<i>E2348C_2634</i>	601	TCTGCTGAATACCGCGCAATCCCGCTTGATATTGCAGGGGTTTAA	645
<i>ROD_RS01485</i>	601	TCTGATGAATACCGCGCAATCCCGCTTGATATTGCAGGGGTTTAA	645

Figura 18. Alineamiento global por pares de las secuencias nucleotídicas de *E2348C_2634* (EPEC) y *ROD_RS01485* (*C. rodentium* ICC168) en la herramienta EMBOSS-Needle.

```

E2348C_2636          1  ATGAACGCGAAACGCTTTAATCAGCTATATCCGCCAGGGACTCGCTTCAT          50
|||||.|||||.|||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.||| |
ROD_RS25780         1  ATGAATGCGAAGAACTTTAATCAGCTATATCCGGTGGGGACTCGTTT--T          48

E2348C_2636          51  GCACATTGC-ACATCGGGCAGTG---CGTGGTGGTCCGGTGGTAAAAACT          96
.||||||.|||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.  |
ROD_RS25780         49  ACACATACCGACA--GCGCAGTGTGGTTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGT  96

E2348C_2636          97  GTTGACCTGCCAGAGATTTTTAAATGTGGTTGTGTGGTTGAAATTAATGT          146
|||||.|||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.  |
ROD_RS25780         97  GTTGCGCCAGCCAGAGATTTTTAAATGTGGTTGTGTGGTTGAAATTAATGT          146

E2348C_2636          147  CGAGCCTTATTTCGTTAAAAGTCGAAACTGAAAGCACCGCATTAA          192
|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.  |
ROD_RS25780         147  CGAGCCTTATTTCGTTAAAAGTCGAAACTGAAAGCACCGCATTAA          192

```

Figura 19. Alineamiento global por pares de las secuencias nucleotídicas de *E2348C_2636* (EPEC) y *ROD_RS25780* (*C. rodentium* ICC168) en la herramienta EMBOSS-Needle.

```

CAS10182.1          1  MTTENKVKQYTKTQAPEGYWVDARGVMTPESLIKDIDRDREQLVGEIVEM          50
|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.  |
WP_000206136.1     1  MTTENKVKQYTKTQAPEGYWVDARGVMTPESLIKDIDRDREQLVGEIVEM          50

CAS10182.1          51  VIAASASLRELKLRQAFIDLSAEKYGAVKGGKKNITLYSFDGRY             100
|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.  |
WP_000206136.1     51  VIAASASLRELKLRQAFIDLSAEKYGAVKGGKKNITLYSFDGRY             100

CAS10182.1          101  KIQRAMQDRIAFDERIQTAQSLIDDLADWTEGARPEIKAIIEAFSTDK          150
|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.  |
WP_000206136.1     101  KIQRAMQDRIAFDERIQTAQSLIDDLADWTEGARPEIKAIIEAFSTDK          150

CAS10182.1          151  EGNINTGRVLALRRLEIEDERWNNAMSLIGEAVQVIGSKSYIRVYERVD          200
|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.  |
WP_000206136.1     151  EGNINTGRVLALRRLEIEDERWNNAMTSLIGEAVQVIGSKSYIRVYERVD          200

CAS10182.1          201  SAEYRAIPLDIAGV              214
|.|||||.|||||.|||||.|||||.  |
WP_000206136.1     201  SDEYRAIPLDIAGV              214

```

Figura 20. Alineamiento global por pares de las secuencias aminoacídicas de *CAS10182.1* (EPEC) y *WP_000206136.1* (*C. rodentium* ICC168) en la herramienta EMBOSS-Needle.

```

CAS10184.1          1  MNAKRFNQLYPPGTRFMHIAHRAVRRVVKTVAPARDFKCGCVVEINVE          50
|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.  |
WP_012904652.1     1  MNAKNFNQLYPVGTRFTHDTSVAVFGCGRNVVKTVAPARDFKCGCVVEINVE          50

CAS10184.1          51  PYFVKVETLKAPH              63
|||||.|||||.|||||.|||||.  |
WP_012904652.1     51  PYFVKVETLKAPH              63

```

Figura 21. Alineamiento global por pares de las secuencias aminoacídicas de *CAS10184.1* (EPEC) y *WP_012904652.1* (*C. rodentium* ICC168) en la herramienta EMBOSS-Needle.