

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA**

**PAPEL DE LA PROTEÍNA LRP EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS
GENES INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE LA TOXINA TILIVALINA DE
*KLEBSIELLA OXYTOCA***

POR:

QBP. MAYRA NAYELY ROBLES LEYVA

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

JUNIO DE 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., 29 de junio de 2022.
Oficio: 23/CA/SIP/22

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
P R E S E N T E

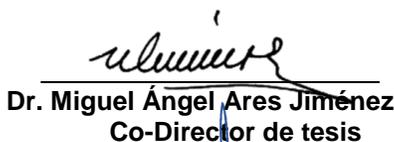
Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: “Papel de la proteína Irp en la regulación de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de la toxina tilivalina de *Klebsiella oxytoca*”, presentada por la Q.B.P. Mayra Nayely Robles Leyva, alumna del programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología.

Después de la revisión, indicamos a la tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

A t e n t a m e n t e
“Por la ciencia para bien del hombre”



M.C. Tania Samantha Siqueiros Cendón
Directora de tesis



Dr. Miguel Ángel Ares Jiménez
Co-Director de tesis



Dr. Miguel Ángel De la Cruz Villegas
Asesor de tesis



Dr. Quintín Rascón Cruz
Asesor de tesis



Dra. Blanca Flor Iglesias Figueroa
Asesora de tesis



Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado



*El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

Chihuahua, Chihuahua 21 junio 2022

Dr. Jaime Raúl Adame Gallegos

Coordinador Académico de posgrado

FCQ UACH

P R E S E N T E . –

Aprovechamos para saludarlo e informarle que se llevó acabo la revisión de la tesis titulada “Papel de la proteína Irp en la regulación de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de la toxina tilivalina de *klebsiella oxytoca*” presentado por la **alumna QBP Mayra Nayely Robles Leyva** con número de matrícula 291798 del programa de maestría en biotecnología.

Concluido el trabajo experimental, se realizó la revisión del trabajo escrito y después de hacer las correcciones necesarias, manifestamos que se han cumplido los objetivos señalados para proceder a la revisión del escrito por parte del comité de t4sis y posteriormente con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado.

A t e n t a m e n t e


MC Tania S Siqueiros Cendón

Directora Interna


Dr Miguel Ángel Ares Jiménez

Director Externo



El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMNSXXI) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Hoja de agradecimientos

“A ti, Dios de mis padres, te doy gracias y te alabo, porque me has dado fuerza y sabiduría, y ahora me has revelado lo que te pedimos”

Daniel 2:23

A mi familia, gracias por creer en todos los sueños que esta persona tan inquieta tiene, pero, sobre todo, gracias por todo el amor que me dan, eso logra motivarme más que mil palabras.

A mi esposo, nunca me cansaré de decirte gracias una y otra vez por dejar que el límite para ambos solo sea el cielo y por ser los propulsores que me hacen acercarme a él.

A Arlett, mi otra mitad dentro de este mundo llamado el posgrado, sin tu ayuda, tus pláticas y todos los momentos en que me levantaste cuando estaba por dejarlo todo no lo hubiera logrado.

A mis compañeros de generación Alejandro, Lenin, Margarita, Quetzal, Andrea y Kenia, ustedes siempre estuvieron ahí para apoyarnos y darnos ánimos entre todos.

A mis amigas Cynthia, Sarahí y Sofi, por llorar y reír conmigo cada vez que necesitaba alguien con quien olvidarme de mis problemas.

A Diana Valverde y todos mis compañeros en Ciudad de México, gracias por el conocimiento transmitido y la paciencia de enseñarme.

A los dos directores de tesis más exigentes que el destino pudo poner en mi camino. Doctor Miguel Ares gracias por ser esa persona que me sacó de mi zona de confort, por su exigencia y todos los conocimientos que me transmitió y que sé

seguirá inculcando en este pequeño cerebro, gracias por depositar su confianza en mí aún sin conocerme. Maestra Tania Siqueiros, sin querer todos los caminos siempre me llevan a usted, aunque el inicio de esto fue algo inesperado nunca me soltó y siempre creyó en mi y en las habilidades que tengo, gracias por ser mi madre académica y guiarme por este mundo de la investigación.

Al Doctor Quintín Rascón y la Dra. Blanca Flor Iglesias, con ustedes empezó todo este camino de la investigación, fueron quienes me guiaron y dieron los primeros conocimientos de lo que es ser un investigador, muchas gracias por seguir guiando mi camino y ser esas personas de confianza que siempre me brindan su tiempo y conocimiento para llegar más lejos.

Al Doctor Miguel de la Cruz, aunque nuestros caminos se cruzaron por un tiempo más breve el conocimiento que dejó en mi seminario tras seminario fue enorme.

A la beca Robles, una beca tan especial como lo es el amor que mi papá tiene por mí, sin tu apoyo no estaría culminando mi posgrado, gracias por depositar tu fe (y la inscripción semestre a semestre) en mí.

A la Facultad de Ciencias Químicas por haberme permitido estudiar y culminar mis estudios de maestría.

A CONACYT por la beca otorgada, medios sin los cuales no estaría terminando mi maestría.

Dedicatoria

Para mi familia; mamá y papá, gracias por siempre creer y demostrarme que la única limitante para lograr lo que quiero está en mi imaginación, sin la educación y los valores que me inculcaron esta tesis no existiría.

A mi hermano, Eduardo, por dejarme mostrar mi lado humano e imperfecto y aún así amarlo e impulsarme.

A mi esposo, Alex, nadie mejor que tu sabe lo que estos dos años significan para mí, gracias por viajar conmigo y por dejarme soñar y lograr, por esa actitud que siempre vuela sobre las nubes y me cree capaz de todo.

A Amelia Ainoa, aunque aún no nacías fuiste parte de la recta final en este proyecto de mi vida y de ahora en adelante te sumas a una de las razones para siempre dar lo mejor de mí.

A mi abuela Ene, se que siempre estoy en tus oraciones y el tenerte en mi vida es una de las mayores bendiciones.



Contenido

| | | |
|-------|---|----|
| I. | Resumen | 13 |
| II. | Abstract..... | 14 |
| III. | Introducción | 15 |
| IV. | Antecedentes..... | 17 |
| 4.1 | El género <i>Klebsiella</i> | 17 |
| 4.2 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 18 |
| 4.3 | Informes sobre la prevalencia de <i>K. oxytoca</i> productora de citotoxina . | 20 |
| 4.4 | Colitis hemorrágica asociada a antibióticos (CHAA) | 21 |
| 4.5 | La toxina tilivalina (TV) | 23 |
| 4.6 | Islas de patogenicidad..... | 25 |
| 4.6.1 | Isla de patogenicidad asociada a la tilivalina..... | 26 |
| 4.7 | Proteína Lrp..... | 27 |
| V. | Justificación | 31 |
| VI. | Hipótesis..... | 31 |
| VII. | Objetivo general | 32 |
| VIII. | Objetivos específicos..... | 32 |
| IX. | Materiales y Métodos | 33 |
| 9.1 | Material biológico | 33 |
| 9.2 | Medios de cultivo..... | 33 |
| 9.3 | Antibióticos | 33 |
| 9.4 | Equipo de laboratorio | 34 |
| 9.5 | Generación de la cepa mutante Δlrp de <i>K. oxytoca</i> | 35 |



| | | |
|--------|---|----|
| 9.6 | Curvas de crecimiento | 39 |
| 9.7 | Extracción del ARN total | 39 |
| 9.8 | Obtención de ADNc | 40 |
| 9.9 | Amplificación de los genes <i>aroX</i> , <i>npsA</i> y <i>rrsH</i> por PCR en tiempo real | 41 |
| 9.10 | Determinación de la expresión genética relativa..... | 41 |
| 9.11 | Análisis estadístico de los resultados de expresión genética..... | 42 |
| 9.12 | Sobreexpresión, purificación y diálisis de la proteína Lrp | 42 |
| 9.12.1 | Sobreexpresión de la proteína Lrp..... | 42 |
| 9.12.2 | Purificación de la proteína Lrp | 42 |
| 9.12.3 | Diálisis de la proteína Lrp | 43 |
| 9.13 | Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) de la proteína Lrp recombinante | 43 |
| 9.14 | Ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA) | 44 |
| 9.15 | Comparación <i>in silico</i> de la secuencia nucleotídica del gen <i>lrp</i> de <i>K. oxytoca</i> con otras bacterias | 46 |
| 9.16 | Comparación <i>in silico</i> de la proteína Lrp de <i>K. oxytoca</i> con otras Lrp. . | 46 |
| 9.17 | Modelación de ligando y Docking molecular | 46 |
| 9.18 | Identificación <i>in silico</i> de posibles promotores para los genes <i>aroX</i> y <i>npsA</i> | 47 |
| X. | Resultados y discusión..... | 48 |
| 10.1 | Caracterización de la cepa Δlrp | 48 |
| 10.2 | Cinéticas de crecimiento | 49 |
| 10.3 | Extracción de ARN..... | 50 |
| 10.4 | Expresión del gen normalizador..... | 52 |
| 10.5 | Expresión de los genes <i>aroX</i> y <i>npsA</i> | 52 |



| | | |
|-------|---|----|
| 10.1 | Sobreexpresión y purificación de la proteína Lrp | 56 |
| 10.2 | Unión de la proteína Lrp a la región intergénica de los genes <i>aroX</i> y <i>npsA</i> | 57 |
| 10.3 | Análisis de alineamiento de nucleótidos | 58 |
| 10.4 | Análisis de alineamiento de aminoácidos | 59 |
| 10.5 | Docking molecular | 62 |
| 10.6 | Identificación <i>in silico</i> de promotores para <i>aroX</i> y <i>npsA</i> | 67 |
| XI. | Conclusiones | 70 |
| XII. | Recomendaciones..... | 71 |
| XIII. | Referencias | 72 |



Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla I. Secuencia de los oligonucleótidos para la mutagénesis del gen <i>lrp</i> de <i>K. oxytoca</i> | 35 |
| Tabla II. Secuencia de los oligonucleótidos para comprobar la correcta inserción del gen de resistencia a kanamicina en las cepas mutantes. | 38 |
| Tabla III. Volúmenes utilizados para la preparación del gel de poliacrilamida al 15 % | 44 |
| Tabla IV. Secuencia de los oligonucleótidos para amplificar por PCR las secuencias reguladoras de los genes a analizar en los EMSA. | 45 |
| Tabla V. Alineamiento de nucleótidos de la proteína Lrp de <i>K. oxytoca</i> con diversas bacterias..... | 59 |



Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Microscopía electrónica de barrido de <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 17 |
| Figura 2. Factores de virulencia de <i>Klebsiella oxytoca</i> | 19 |
| Figura 3. Patogénesis de <i>Klebsiella oxytoca</i> productora de citotoxina..... | 22 |
| Figura 4. Estructura química de la tilivalina..... | 23 |
| Figura 5. Reacciones iniciales para la biosíntesis de la tilivalina de <i>K. oxytoca</i> | 24 |
| Figura 6. Reacciones intermedias para la biosíntesis de la tilivalina de <i>K. oxytoca</i> | 24 |
| Figura 7. Reacciones finales para la biosíntesis de la tilivalina de <i>K. oxytoca</i> | 25 |
| Figura 8. Organización genética de la isla de patogenicidad asociada a la TV de <i>K. oxytoca</i> | 26 |
| Figura 9. Proteína Lrp de <i>Escherichia coli</i> | 28 |
| Figura 10. Amplificación del gen de resistencia a kanamicina. | 36 |
| Figura 11. Transformación de <i>K. oxytoca</i> conteniendo el pKD119 con el fragmento de PCR..... | 37 |
| Figura 12. Caracterización de las cepas mutantes \square/lrp candidatas mediante la amplificación por PCR del gen de resistencia a la kanamicina y del gen <i>lrp</i> de <i>K. oxytoca</i> | 49 |
| Figura 13. Cinéticas de crecimiento de las cepas de <i>K. oxytoca</i> . Las cepas silvestre y mutante Δ/lrp se cultivaron en MM-N sin y con leucina y se incubaron a 37°C en agitación por 12 h. A) Cinéticas de crecimiento en MM-N sin leucina B) Cinéticas de crecimiento en MM-N con leucina (100 mg/mL). La absorbancia se midió cada hora a una longitud de onda de 600 nm. Las barras de error indican la desviación estándar de tres eventos independientes..... | 50 |
| Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes del ARN ribosomal (23S y 16S)..... | 51 |
| Figura 15. Expresión del gen <i>aroX</i> involucrado en la síntesis del precursor químico de la tilivalina..... | 53 |
| Figura 16. Expresión del gen <i>npsA</i> involucrado en la etapa final de la síntesis de tilivalina | 54 |



| | |
|--|----|
| Figura 17. Electroforesis de la proteína recombinante Lrp en gel de poliacrilamida. | 56 |
| Figura 18. Electroforesis de la proteína Lrp dializada en gel de poliacrilamida | 57 |
| Figura 19. Ensayo de movilidad electroforética muestra la unión de Lrp a la región intergénica de los genes <i>aroX</i> y <i>npsA</i> | 58 |
| Figura 20. Alineamiento múltiple con Clustal Omega..... | 60 |
| Figura 21. Modelado tridimensional de las proteínas Lrp | 61 |
| Figura 22. Modelado tridimensional de Lrp | 62 |
| Figura 23. Acoplamiento molecular entre el ADN <i>aroX-npsA</i> con el dímero de Lrp de <i>K. oxytoca</i> | 63 |
| Figura 24. Acercamiento al acoplamiento molecular entre el ADN <i>aroX-npsA</i> con el dímero de Lrp de <i>K. oxytoca</i> | 64 |
| Figura 25. Acoplamiento molecular entre el ADN <i>aroX-npsA</i> con el dímero de Lrp de <i>K. oxytoca</i> | 65 |
| Figura 26. Acercamiento al acoplamiento molecular entre el DNA <i>aroX-npsA</i> con el dímero de Lrp de <i>K. oxytoca</i> | 66 |
| Figura 27. Identificación <i>in silico</i> del promotor para el gen <i>aroX</i> | 68 |
| Figura 28. Identificación <i>in silico</i> del promotor para el gen <i>npsA</i> | 69 |

I. Resumen

Klebsiella oxytoca es una bacteria Gram negativa que forma parte de la microbiota intestinal; sin embargo, en algunos pacientes que son tratados con antibióticos (principalmente penicilinas) esta bacteria prolifera y produce colitis hemorrágica asociada a antibióticos (CHAA). La CHAA es causada por la toxina tilivalina, la cual es un metabolito sintetizado por enzimas que están codificadas en dos operones dentro de una isla de patogenicidad, siendo *aroX* y *npsA* los primeros genes de cada operón. Por otro lado, la proteína Lrp es un regulador global de la transcripción de islas de patogenicidad y factores de virulencia en diversas bacterias. Para investigar si la proteína Lrp regula la expresión de los genes involucrados en la síntesis de la tilivalina, a partir de la cepa de *Klebsiella oxytoca* MIT 09-7231 (silvestre) se generó la delección del gen *lrp*, el cual codifica para la proteína reguladora Lrp, y se obtuvo la cepa mutante Δlrp . Se determinaron las curvas de crecimiento de las cepas silvestre y mutante Δlrp en medio mínimo N sin y con leucina. La mutación en el gen *lrp* afectó el crecimiento bacteriano en las fases logarítmica y estacionaria en el medio sin leucina; sin embargo, en el medio con leucina, el crecimiento de la cepa mutante Δlrp solo estuvo afectado en la fase logarítmica. Se aisló ARN total de ambas cepas y se midió la transcripción de los genes *aroX* y *npsA* mediante RT-PCR en tiempo real. Se obtuvo la proteína Lrp recombinante y se analizó su unión a la región reguladora intergénica de *aroX* y *npsA* mediante ensayos de retardo en la movilidad electroforética. Finalmente, se realizaron análisis *in silico* para identificar posibles promotores y sitios de unión de Lrp sobre la región reguladora intergénica de *aroX* y *npsA*. La expresión de ambos genes (*aroX* y *npsA*) disminuyó 30 veces en la cepa Δlrp con respecto a la cepa silvestre. La proteína recombinante Lrp se unió a la región intergénica de *aroX* y *npsA*. Se identificó un posible promotor para el gen *aroX* y otro para el gen *npsA*. Mediante docking molecular, se determinaron dos posibles sitios de unión para la proteína Lrp. En conjunto, estos resultados indican que el regulador Lrp activa la transcripción de los operones involucrados en la síntesis de tilivalina y que dicha regulación es de manera directa mediante la interacción de Lrp con la región intergénica de *aroX* y *npsA* a través de la unión a dos posibles sitios de reconocimiento de Lrp.



II. Abstract

Klebsiella oxytoca is a Gram-negative bacterium that is part of the intestinal microbiota; however, in some patients who are treated with antibiotics (mainly penicillins), this bacterium proliferates and causes antibiotic-associated hemorrhagic colitis (AAHC). AAHC is caused by the toxin tilivalin, which is a metabolite synthesized by enzymes that are encoded in two operons within a pathogenicity island. On the other hand, the Lrp protein is a global regulator of the transcription of islands of pathogenicity and virulence factors in various bacteria. To investigate whether the Lrp protein regulates the expression of the genes involved in the synthesis of tilivalin, from the *Klebsiella oxytoca* strain MIT 09-7231 (wild), the deletion of the *lrp* gene will be used, which encoded for the regulatory protein Lrp, and the mutant strain Δlrp was obtained. The growth curves of the wild-type and Δlrp mutant strains were determined in minimal medium N without and with leucine. The mutation in the *lrp* gene affected bacterial growth in the logarithmic and stationary phases in the medium without leucine; however, in the medium containing leucine, the bacterial growth of the Δlrp mutant strain was only affected in the logarithmic phase. Total RNA was isolated from both strains and the transcription of the *aroX* and *npsA* genes was measured by real-time RT-PCR. Recombinant Lrp protein was obtained and its binding to the intergenic regulatory region of *aroX* and *npsA* was analyzed by electrophoretic mobility retardation assays. Finally, an *in silico* analysis was performed to identify possible Lrp promoters and binding sites on the intergenic regulatory region of *aroX* and *npsA*. The expression of both genes (*aroX* and *npsA*) occurred 30 times in the Δlrp strain compared to the wild-type strain. The recombinant protein Lrp bound to the intergenic region of *aroX* and *npsA*. A possible promoter for the *aroX* gene and another for the *npsA* gene were identified. By molecular docking, two potential binding sites for the Lrp protein were determined. Taken together, these results indicate that the regulator Lrp activates the transcription of the operons involved in tilivalin synthesis and that said regulation is directly through the interaction of Lrp with the intergenic region of *aroX* and *npsA* by binding to two putative sites of Lrp recognition.

III. Introducción

Klebsiella oxytoca es un bacilo Gram negativo, no móvil, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es ubicua del ambiente y puede ser cultivada a partir de piel, membranas mucosas, orofaringe e intestino de humanos y animales sanos. De hecho, *K. oxytoca* se aísla del intestino de personas sanas con una frecuencia del 2 al 10%. Al igual que *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* es un patógeno oportunista que se aísla con alta frecuencia de infecciones asociadas a la atención a la salud y se considera el segundo patógeno más importante dentro del género *Klebsiella* (Herzog *et al.*, 2014; Herridge *et al.*, 2020).

Un gran número de microorganismos colonizan la mucosa intestinal formando un complejo ecosistema. La importancia de esta diversa microbiota para la adecuada función y salud intestinal se vuelve evidente una vez que el balance de este ecosistema es perturbado, lo cual puede ocurrir por un crecimiento predominante de una sola especie después de la administración prolongada de antibióticos (Savino *et al.*, 2009).

En los últimos años, se ha reconocido a *K. oxytoca* como el agente causal de la colitis hemorrágica asociada a antibióticos (CHAA) cuya sintomatología principal incluye diarrea hemorrágica y dolor abdominal, tal patología es originada por cepas de *K. oxytoca* que secretan la citotoxina tilivalina (TV) hacia el intestino del huésped (Schneditz *et al.*, 2014; Hering *et al.*, 2019; Unterhauser *et al.*, 2019).

La CHAA está estrechamente asociada con el aumento en el crecimiento enterobacteriano del patobionte *K. oxytoca*, el cual es estimulado por antibióticos (principalmente las penicilinas). Después del tratamiento con penicilinas, se desencadena la disbiosis acompañada de la aparición repentina de sangre, diarrea y calambres abdominales. *K. oxytoca* no es afectada con dichos antibióticos debido a que expresa constitutivamente genes que le confieren resistencia a las penicilinas (Schneditz *et al.*, 2014).

En 2014 se identificó el grupo de genes que constituyen la vía biosintética de la TV. Además, se demostró que la TV induce apoptosis en células Hep-2 y que este grupo de genes era necesario para ocasionar la CHAA en modelos murinos. A diferencia de otras toxinas, la TV no es una proteína si no un metabolito pentacíclico de la familia de las pirrolobenzodiacepinas (Schneditz *et al.*, 2014).

El grupo de genes que codifican para la síntesis de la TV son parte de dos operones organizados dentro de una isla de patogenicidad. El operón *aroX* codifica para cinco genes denominados: *aroX*, *dhbX*, *icmX*, *adsX* y *hmoX*. El operón NRPS codifica para tres genes denominados: *npsA*, *thdA* y *npsB* (Schneditz *et al.*, 2014; Dornisch *et al.*, 2017; Tse *et al.*, 2017).

La proteína Lrp (**L**eucine-**r**esponsive **r**egulatory **p**rotein, por sus siglas en inglés), es un regulador transcripcional global que se encuentra altamente conservado en las enterobacterias; sin embargo, se encuentra presente también en otras familias bacterianas, incluyendo otras bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas y Arqueas. Lrp puede actuar como activador o como represor de la expresión genética en respuesta al ambiente nutricional mediante la unión de moléculas efectoras (principalmente aminoácidos). Lrp es partícipe de diversas funciones celulares dentro de las cuales se incluyen: el metabolismo de aminoácidos, la resistencia al estrés, el transporte de nutrientes, la resistencia a antibióticos y la virulencia (Haney *et al.*, 1992; Willins *et al.*, 1991; Baek *et al.*, 2009; Freddolino *et al.*, 2021).

Estructuralmente, Lrp posee, en su extremo amino, un motivo HTH (**H**elix-**T**urn-**H**elix, por sus siglas en inglés) con el cual se une al ADN para regular la transcripción. Y posee, en su extremo carboxilo, un motivo denominado RAM (**R**egulator of **A**mino acid **M**etabolism, por sus siglas en inglés). El motivo RAM de un monómero se une con otro por interacciones hidrofóbicas formando un homodímero el cual se une al ADN. Cada dímero de Lrp se puede unir con tres dímeros más formando un octámero simétrico. Además, en el motivo RAM se une la leucina y se ha propuesto que dicha unión favorece la estabilidad del octámero, incrementando su afinidad para unirse al ADN (Chen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; de los Ríos *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2008).

IV. Antecedentes

4.1 El género *Klebsiella*.

El género *Klebsiella* (Figura 1) fue descrito por primera vez en 1881 por Von Frisch, quien observó éste bacilo en muestras de pacientes con rinoescleroma. El género fue nombrado por Trevisan en 1885, en honor al físico y patólogo Edwin Klebs. Las especies que conforman a este género se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, inmóviles, capsulados, oxidasa negativos, que producen la enzima lisina descarboxilasa. Taxonómicamente, pertenecen al reino *Bacteria*, filum *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, al orden *Enterobacterales* y a la familia *Enterobacteriaceae* (Janda y Abbot, 2021). Estas bacterias son ubicuas en el medio ambiente y son microorganismos saprofitos que pueden formar parte de la microbiota del sistema respiratorio e intestinal. Actualmente, se reconocen 13 especies del género *Klebsiella*: *K. aerogenes*, *K. granulomatis*, *K. mobilis*, *K. ornithinolytica*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae*, *K. planticola*, *K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. singaporensis*, *K. terrigena*, *K. trevisanii* y *K. variicola* (Boye y Hansen, 2003; Gutierrez *et al.*, 2009).

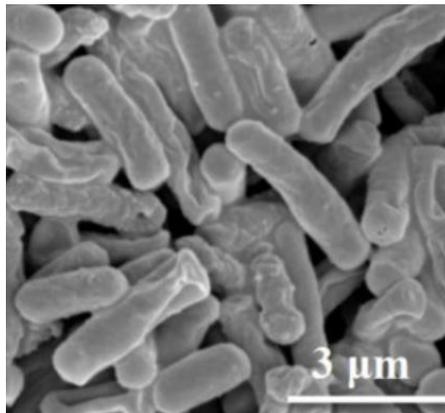


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido de *Klebsiella pneumoniae*. Tomado de Hasemi., *et al.*, 2018.

El género *Klebsiella* ha tomado gran importancia como patógeno de humanos y se ha visto implicado en el incremento de morbilidad de los pacientes. Las infecciones con bacterias de este género prolongan la estadía de los pacientes en los hospitales. Las especies de *Klebsiella* generalmente son causa de bronconeumonía, infección en el tracto urinario y septicemia (Singh *et al.*, 2016).

Las especies del género *Klebsiella* que se aíslan con mayor frecuencia de infecciones en humanos son: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. rhinoscleromatis* y *K. ozaenae*. *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* son los dos agentes principales causantes de infecciones nosocomiales en humanos y son de importancia clínica por su elevada resistencia a diversos antibióticos (Chakraborty *et al.*, 2016).

4.2 *Klebsiella oxytoca*

K. oxytoca se puede detectar en alrededor de un 2 al 10% en el intestino de individuos sanos, razón por la cual es considerado un miembro comensal de la microbiota intestinal (Beaugerie *et al.*, 2003; Högenauer *et al.*, 2006; Zollner-Schwetz *et al.*, 2008).

Las cepas de *K. oxytoca* involucran la producción de beta-lactamasas y carbapenemasas que le confieren a la bacteria resistencia a los antibióticos betalactámicos y carbapenémicos, originando consecuentemente problemas terapéuticos (Decre *et al.* 2004; Lowe *et al.* 2012; Schulz-Stubner y Kniehl 2011; Zarate *et al.* 2008). También se ha reportado que tiene resistencia a otros antibióticos utilizados comúnmente como las fluoroquinolonas y las tetraciclinas (Milatovic *et al.* 2000; Brisse *et al.*, 2009).

Dentro de los factores de virulencia de *K. oxytoca* (Figura 2) se encuentran dos fimbrias: pilus tipo 1 y el pilus tipo 3, estos son los responsables de la adherencia a las células del hospedero y la formación de biopelícula (Darby *et al.*, 2014; Bennett *et al.*, 2015). Los sideróforos (del griego *sideros phoros* "portadores o acarreadores de hierro") son moléculas que actúan como agentes quelantes específicos de hierro. A diferencia de otros nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano, el hierro no se encuentra altamente disponible en los organismos hospederos por lo que los

sideróforos le proporcionan a la bacteria este nutriente, el cual es indispensable para su replicación y su capacidad para producir una infección tanto local como sistémica (Briat *et al.*, 1999; Dellagi *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2022).

K. oxytoca también posee el lipopolisacárido, el cual está conformado por tres dominios cuyas posiciones del exterior al interior son: el antígeno O, el núcleo y el lípido A. El antígeno O le proporciona resistencia frente al efecto bactericida del suero, el núcleo le confiere propiedad antifagocítica y el lípido A presenta actividad endotóxica, la cual activa a los macrófagos e induce una respuesta inflamatoria con un efecto pirogénico (Yang *et al.*, 2022).

Las especies del género *Klebsiella* generalmente desarrollan cápsulas gruesas, las cuales son esenciales para su virulencia debido a que las protegen de la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos, así como de los factores bactericidas que se encuentran en la sangre (efecto sérico), siendo estos últimos, primordialmente, proteínas del complemento, las cuales una vez que se produce su cascada de activación se acumulan y atacan la membrana del microorganismo. La cápsula es considerada el principal factor de virulencia para las bacterias del género *Klebsiella* (Mizuta *et al.*, 1983; Darby *et al.*, 2014).

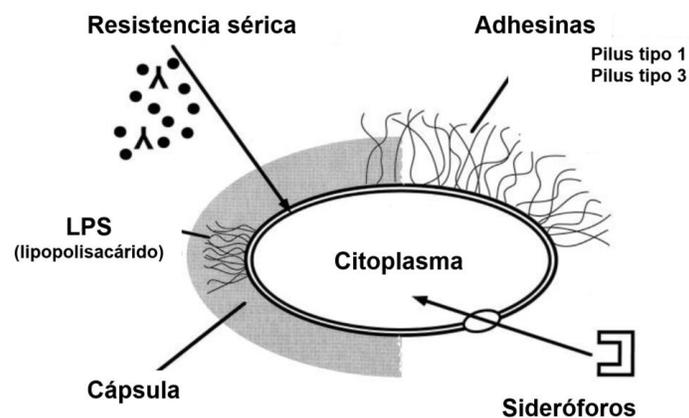


Figura 2. Factores de virulencia de *Klebsiella oxytoca*. Entre los principales factores de virulencia de *K. oxytoca* se encuentran las fimbrias, los sideróforos, el lipopolisacárido y la cápsula. Modificado de Podschun y Ullman, 1998.



Para diferenciar a *K. oxytoca* de las demás especies dentro del género *Klebsiella* se emplea la prueba bioquímica de indol. *K. oxytoca* produce la enzima triptofanasa, la cual hidroliza al triptófano, originando piruvato e indol. El reactivo de Kovacs (*p*-dimetilaminobenzaldehído) reacciona con el indol produciendo un cambio de color de amarillo a rojo (prueba de indol positiva) (Koneman y Allen, 2008).

El primer reporte de la producción de una citotoxina por *K. oxytoca* fue en 1989 por Minami y colaboradores en Japón, quienes aislaron a esta bacteria de pacientes con colitis hemorrágica asociada a la administración de amoxicilina y encontraron que dicha toxina presentaba un efecto citotóxico *in vitro* sobre células HeLa, Hep-2, CHO y Vero.

Se ha demostrado que las cepas de *K. oxytoca* productoras de citotoxina son patobiontes intestinales causantes de la CHAA. Bajo condiciones de disbiosis intestinal, *K. oxytoca* productora de citotoxina desencadena su potencial patógeno. Dentro de las personas vulnerables a contraer una infección por este patógeno se encuentran recién nacidos, niños y personas con deficiencias inmunes (Högenauer *et al.*, 2006).

4.3 Informes sobre la prevalencia de *K. oxytoca* productora de citotoxina

El primer informe sobre la prevalencia de la colonización fecal con *K. oxytoca* productora de citotoxina fue realizado en 2009 en Nueva Escocia, Canadá. Se aisló a este microorganismo en 42 de 429 pacientes (9.8%) con colitis hemorrágica, 10 de los 42 aislamientos (23.8%) fueron citotóxicos (Smith *et al.*, 2009).

Luego, de 2009 a 2011, en Hong Kong, China, se realizaron investigaciones en pacientes hospitalizados con diarrea y colitis hemorrágica. Estos pacientes fueron tratados con antibióticos. De un total de 3,537 muestras de heces, 104 (2.9%) fueron positivas para *K. oxytoca*. Finalmente, se detectaron cepas productoras de citotoxina de *K. oxytoca* en 34 de las 104 muestras (32.7%) (Cheng *et al.*, 2012).

De mayo de 2011 a diciembre de 2012, se realizó un estudio en Austria, en el cual se evaluaron pacientes pediátricos desde recién nacidos hasta los 19 años de edad que presentaban deposiciones con sangre, los cuales se estudiaron prospectivamente en cinco hospitales infantiles. Los pacientes se agruparon en diversos grupos: lactantes (<1 año), niños pre-escolares (1–5 años), niños escolares (6–13 años) y adolescentes (14–19 años). De 221 pacientes con hematoquecia, 17 (7.7%) tuvieron el cultivo de heces positivo para *K. oxytoca*. De los 17 aislados de *K. oxytoca*, en 11 se detectó actividad citotóxica (64.7%) (Stampfer *et al.*, 2017).

4.4 Colitis hemorrágica asociada a antibióticos (CHAA)

Aunque *K. oxytoca* es considerada como una bacteria comensal que forma parte de la microbiota intestinal en ciertos casos puede actuar como un patógeno oportunista, actualmente existen dos tipos de cepas: las que producen la citotoxina TV y las que no la producen. Se ha demostrado que las primeras ocasionan la CHAA (Herzog *et al.*, 2014).

En 2006 se reportó por primera vez que *K. oxytoca* es el agente causal de la CHAA. En tal estudio, se analizaron 22 pacientes con colitis asociada a antibióticos, los cuales presentaron coprocultivo negativo a *Clostridium difficile*, el cual es el principal agente causal de la colitis asociada a antibióticos. De 22 pacientes que estaban recibiendo penicilinas para el tratamiento de alguna otra enfermedad en seis se aisló, de los coprocultivos, a *K. oxytoca*. De las seis cepas aisladas, cinco fueron citotóxicas sobre células epiteliales HEp-2, cuando dichas células se inocularon con los sobrenadantes bacterianos (Högenauer *et al.*, 2006).

Posteriormente, en ese mismo estudio, a los pacientes se les realizó una colonoscopia, observándose edema y hemorragia de la mucosa del colon sin hallazgos de pseudomembranas, confirmando que la patología no era originada por *C. difficile*. A continuación, seis grupos de ratas fueron tratadas con una solución de amoxicilina para eliminar su microbiota intestinal y cinco días después, estas fueron inoculadas con las cepas de *K. oxytoca* citotóxicas. Al comparar las biopsias del colon de las ratas con las biopsias del colon de humanos se encontraron datos de

daño histológico muy similares tales como hemorragia, inflamación de la mucosa e infiltrado de neutrófilos hacia la lámina propia. En este estudio, se concluyó que se debe considerar a *K. oxytoca* productora de citotoxina como el agente causal de la CHAA ya que se cumplieron en su totalidad los postulados de Koch (Högenauer *et al.*, 2006).

La patogenia de la CHAA se ha asociado con cambios disbióticos en el intestino. La disbiosis es un desequilibrio de la microbiota intestinal que puede ser ocasionada por la administración de antibióticos de amplio espectro en pacientes hospitalizados, esto genera un cambio en la microbiota generando un incremento en los organismos patobiontes sobre los simbiosites y comensales causando un daño celular y potenciando una diseminación sistémica e inducción de un choque séptico (Hajishengallis y Lamont, 2016).

En el caso de la CHAA cualquier terapia con penicilinas puede desencadenar la disbiosis ocasionando los síntomas de diarrea hemorrágica y dolores abdominales por el patobionte *K. oxytoca* quien expresa de manera constitutiva genes que le otorgan resistencia a estos antibióticos (Figura 3) (Schneditz *et al.*, 2014; Hajishengallis y Lamont, 2016).

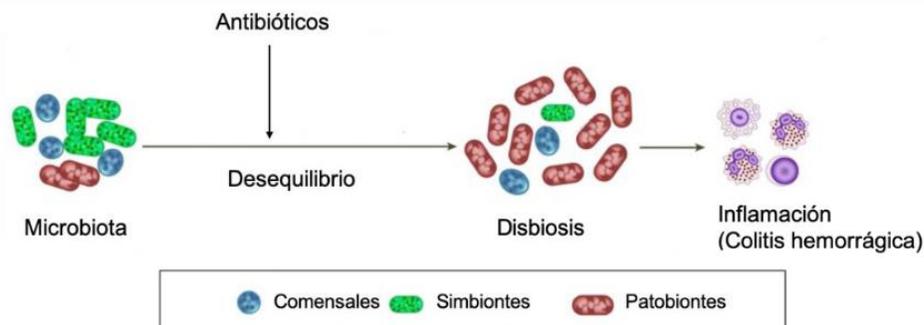


Figura 3. Patogénesis de *Klebsiella oxytoca* productora de citotoxina. La microbiota está conformada por microorganismos comensales, simbiosites y patobiontes, predominando los simbiosites. Después del uso prolongado con antibióticos, ocurre un desequilibrio lo que ocasiona una disbiosis que consta de la disminución de microorganismos comensales y simbiosites y el incremento de patobiontes. La disbiosis intestinal genera un proceso inflamatorio. Específicamente, en el caso de *K. oxytoca* se produce una colitis hemorrágica. Modificado de Hajishengallis y Lamont, 2016.

4.5 La toxina tilivalina (TV)

La TV, un péptido no ribosomal, fue la primer pirrolobenzodiazepina ligada a una enfermedad en el intestino humano. Ya que el organismo productor de esta toxina es *K. oxytoca* y este forma parte de la microbiota intestinal es importante entender la biosíntesis y la regulación de la actividad de la TV.

La TV posee un núcleo de pirrolobenzodiazepina y un sustituyente indol en su estructura, razón por la cual se considera miembro de las pirrolobenzodiazepinas (PBD) (Figura 4) (Thurston, 1999). Algunas actinobacterias como *Streptosporangium sibiricum*, *Streptomyces refuineus subsp. thermotolerans* y *Streptomyces achromogenes* producen sibiromicina, antramicina y tomaymicina, respectivamente, las cuales también son PBD homólogas a la tilivalina (Cipolla *et al.*, 2009).

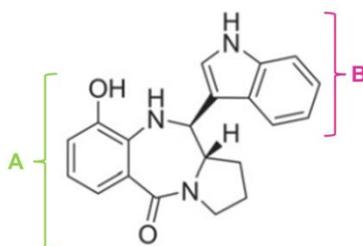


Figura 4. Estructura química de la tilivalina. La TV (5-H-6-indol-9-hidroxi-pirrolobenzodiazepina) posee un núcleo de pirrolobenzodiazepina (A) y un sustituyente indol en la posición seis de dicho núcleo de pirrolobenzodiazepina (B). Tomado de Dornisch *et al.*, 2017.

Aunque el mecanismo de la patogénesis por el cual *K. oxytoca* ocasiona la CHAA no se encuentra completamente elucidado, se ha identificado que la toxina TV causa apoptosis, al observarse un incremento significativo de las caspasas 3 y 7 en los enterocitos tratados con TV *in vitro*. Además, afecta la conformación de la proteína claudina 1, la cual es importante en la formación de las uniones estrechas, al afectarse su conformación por la TV se genera inestabilidad y separación en la barrera apical de los enterocitos. Asimismo, la TV se asocia con la tubulina nuclear de los enterocitos y ejerce un efecto estabilizador sobre los microtúbulos impidiendo la formación del huso mitótico, por lo que detiene la mitosis (impide el paso de G2 a M del ciclo celular) (Schneditz *et al.*, 2014; Hering *et al.*, 2019; Unterhauser *et al.*, 2019).

La biosíntesis de la TV fue propuesta por Dornisch y colaboradores (2017). Los sustratos iniciales para la biosíntesis de la TV son el fosfoenolpiruvato y la eritrosa-4-fosfato; a partir de estos, se sintetiza el corismato mediante las enzimas AroX y AroB y otras enzimas de la vía del shikimato. Posteriormente, se sintetiza el Amino-desoxiisocorismato (ADIC) por la enzima AdsX (Figura 5).

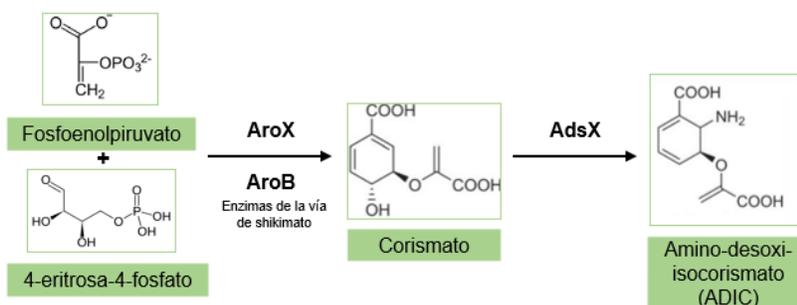


Figura 5. Reacciones iniciales para la biosíntesis de la tilivalina de *K. oxytoca*. Síntesis del amino-desoxiisocorismato (ADIC). Modificado de Dornisch *et al.*, 2017.

En una etapa intermedia, se forma el ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA) por dos vías: en la primera vía, el ADIC se convierte en ácido dihidro-hidroxi-antranílico (DHHA) por medio de la enzima lcmX, posteriormente la enzima DhbX oxida el DHHA a 3HAA. La segunda vía se basa en la biosíntesis de ácido antranílico (AA) a partir de ADIC por un mecanismo desconocido y posteriormente por acción de la enzima HmoX se obtiene el 3HAA (Figura 6).

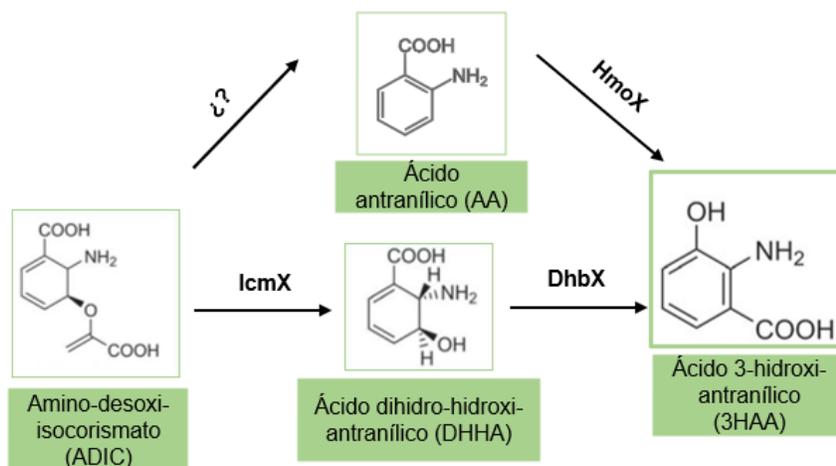


Figura 6. Reacciones intermedias para la biosíntesis de la tilivalina de *K. oxytoca*. Formación del ácido 3-hidroxi-antranílico (3HAA). Modificado de Dornisch *et al.*, 2017.

Finalmente, a través del 3HAA (sustrato del complejo enzimático NpsA/ThdA) y la L-prolina (sustrato de NpsB) se forma la tilimicina (Figura 7). Esto sucede mediante la unión y activación del 3HAA y la L-prolina mediante las sintetas de péptidos no ribosomales NpsA, ThdA y NpsB. La tilimicina se convierte en tilivalina después de un ataque nucleofílico del indol libre, el cual proviene de la escisión enzimática del L-triptófano por la enzima TnaA (triptofanasa) (Dornisch *et al.*, 2017).

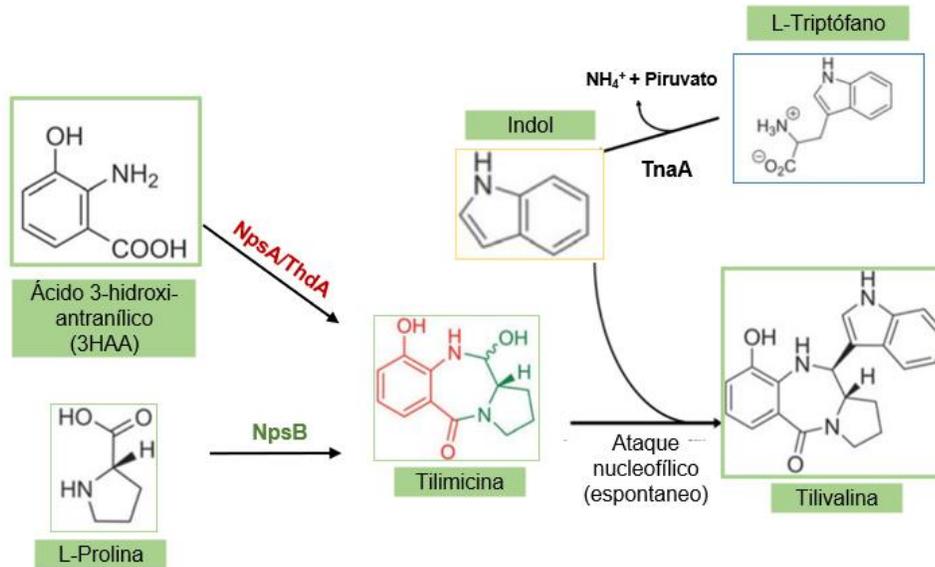


Figura 7. Reacciones finales para la biosíntesis de la tilivalina de *K. oxytoca*. Generación de tilimicina y posterior ataque nucleofílico del indol para dar lugar a la tilivalina. Modificado de Dornisch *et al.*, 2017.

4.6 Islas de patogenicidad

La virulencia y patogénesis de una bacteria patógena es un tema clásico en la bacteriología. Diversos estudios han demostrado que la infección y la patogénesis de las bacterias involucra muchos factores como la motilidad, tolerancia a condiciones de estrés, colonización, formación de biopelícula, invasión, supervivencia intracelular y resistencia a antibióticos, todos estos procesos son determinados por un gran complejo de factores de virulencia y reguladores transcripcionales. En bacterias patógenas, los genes de virulencia pueden estar en el genoma o en agrupaciones genéticas llamadas islas de patogenicidad. Las islas de patogenicidad son elementos genéticos adquiridos por transferencia horizontal durante la evolución (Zhao *et al.*, 2018).

4.6.1 Isla de patogenicidad asociada a la tilivalina

Los genes involucrados en la biosíntesis de la TV forman parte de una isla de patogenicidad (Figura 8), en la cual se encuentran un grupo de genes localizados en dos operones que codifican para enzimas involucradas en dicha síntesis: el operón *aroX* (*aroX*, *dhbX*, *icmX*, *adsX* y *hmoX*) y el operón *NRPS* (*npsA*, *thdA* y *npsB*) (Schneditz *et al.*, 2014).

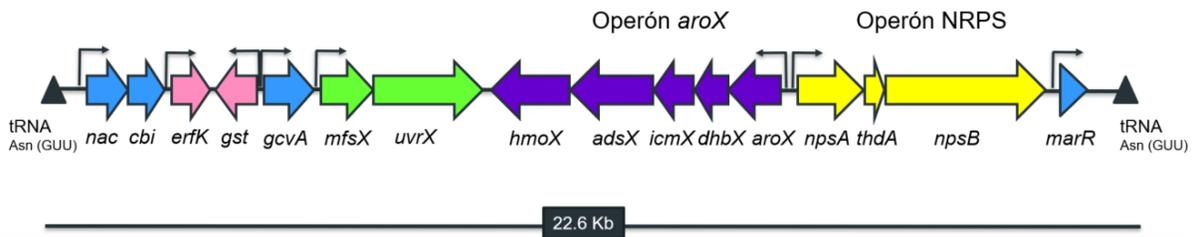


Figura 8. Organización genética de la isla de patogenicidad asociada a la TV de *K. oxytoca*. La isla tiene un tamaño de 22.6 Kb, se compone de 16 genes y está flanqueada por dos secuencias que codifican para tRNA de asparagina. Tiene dos operones involucrados en la biosíntesis de la TV: el operón *aroX* (morado) y el operón *NRPS* (amarillo), un operón bicistrónico cuyos genes codifican para una permeasa y una escinucleasa (verde), genes que codifican para reguladores transcripcionales (azul) y finalmente genes no relacionados con la tilivalina (rosa). Modificado de Schneditz *et al.*, 2014.

La TV es sintetizada por un grupo de enzimas que están codificadas en dos operones. El primer operón se denomina “operón *aroX*” y está involucrado en la síntesis del precursor químico de la TV. Está conformado por los genes *aroX*, *dhbX*, *icmX*, *adsX* y *hmoX*. El segundo operón se denomina operón *NRPS* y está involucrado en la etapa final de la síntesis de la TV. Está conformado por los genes *npsA*, *thdA* y *npsB*. Existe un tercer operón formado por los genes *mfsX* y *uvrX*, los cuales codifican para una permeasa de membrana interna y para una escinucleasa, respectivamente. Dentro de la isla de patogenicidad se encuentran cuatro genes que codifican para posibles reguladores transcripcionales los cuales son:

- *nac*: codifica para un regulador transcripcional de la familia LysR implicado en la asimilación de nitrógeno.
- *cbi*: codifica para un regulador transcripcional de la familia LysR implicado en la utilización de alcano sulfonato.

- *gcvA*: codifica para un regulador transcripcional de la familia LysR implicado en el metabolismo de la glicina.
- *marR*: de la familia con el mismo nombre MarR y codifica para una proteína reguladora involucrada con la múltiple resistencia a antibióticos.

Los genes *erfK* y *gst* codifican para una L-D transpeptidasa y para una glutatión S-transferasa, respectivamente (Dornisch *et al.*, 2017).

4.7 Proteína Lrp

La proteína Lrp o “Proteína reguladora de respuesta a leucina” (**L**eucline-responsive **r**egulatory **p**rotein, por sus siglas en inglés) es crucial en la regulación del metabolismo, virulencia y motilidad en respuesta a condiciones ambientales. Se ha demostrado que Lrp activa o reprime aproximadamente 10% de los genes en *Escherichia coli*, influyendo en una variedad de procesos celulares, tales como: síntesis, degradación y transporte de aminoácidos, expresión de porinas y formación del pilus, entre otros (Haney *et al.*, 1992; Willins *et al.*, 1991).

Lrp es una proteína de 18kDa formada por un motivo de unión a ADN hélice-giro-hélice o HTH (**H**élice-**T**urn-**H**élice, por sus siglas en inglés) y un motivo regulador del metabolismo de aminoácidos o RAM (**R**egulator of **A**mino acid **M**etabolism, por sus siglas en inglés) (Figura 9a). El motivo RAM de un monómero se une con otro por interacciones hidrofóbicas formando un homodímero el cual se une al ADN (Figura 9b). Cada dímero de Lrp se puede unir con tres dímeros más formando un octámero simétrico (Figura 9c). *In vivo* los estados octamérico y hexadecamérico existen en equilibrio (De los Ríos y Perona, 2007). La unión de leucina al motivo RAM favorece la formación de los octámeros (Chen *et al.*, 2002). En estudios previos se ha analizado la unión de Lrp a distintos promotores para demostrar su capacidad de regular la transcripción y se ha reportado que la afinidad de unión al ADN incrementa, en la mayoría de los casos, al adicionar leucina (Ho *et al.*, 2017; McFarland *et al.*, 2007); sin embargo, en otro estudio se reportó que la presencia de la leucina puede potenciar, inhibir o no tener efecto sobre Lrp (Cho *et al.*, 2008).

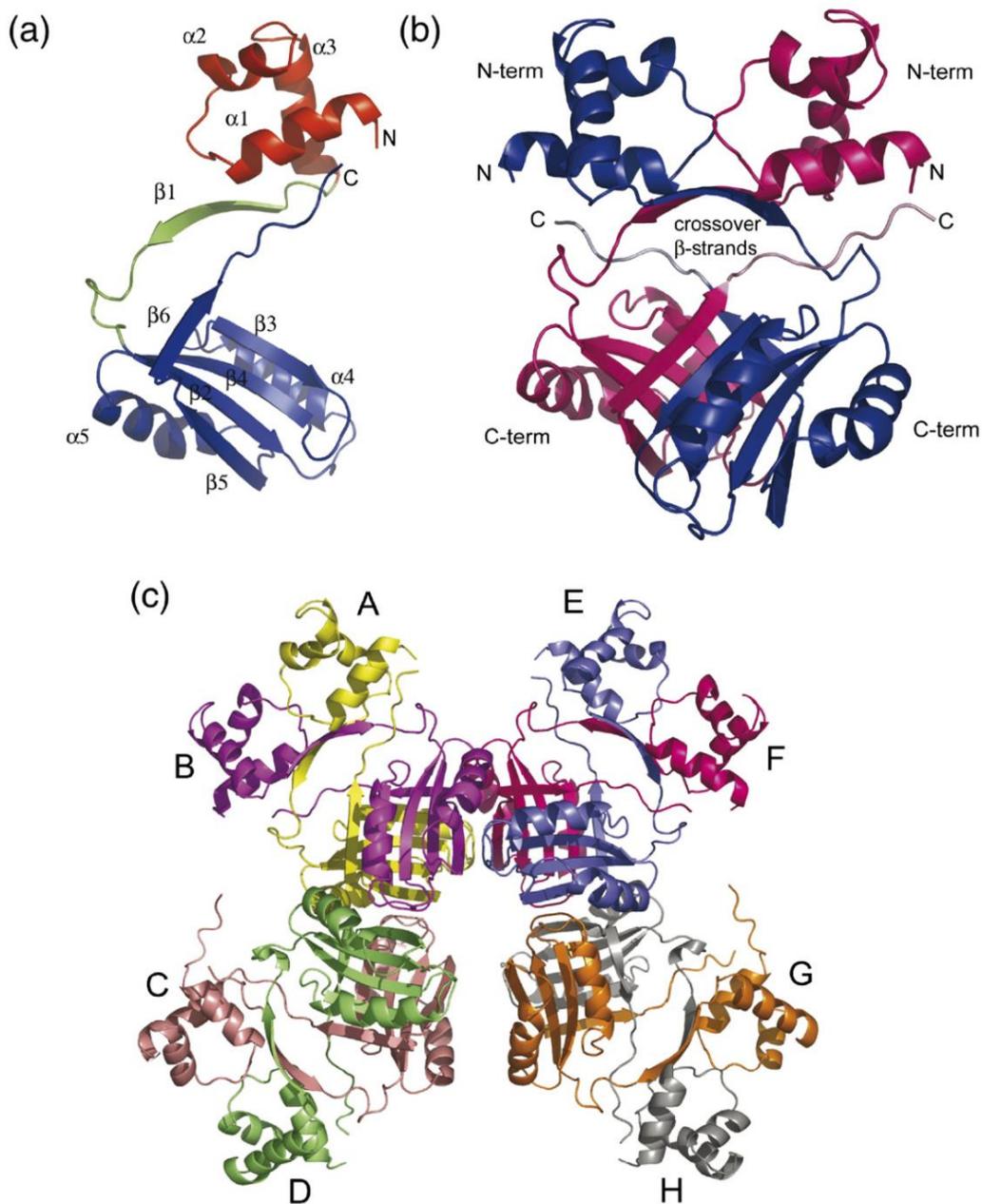


Figura 9. Proteína Lrp de *Escherichia coli*. a) Monómero de Lrp. El motivo HTH se localiza en el dominio N-terminal y se observa en color rojo, el péptido conector en verde y el dominio C-terminal en azul, en el cual se localiza el motivo RAM. b) Dímero de Lrp. Un monómero se representa en azul y el otro monómero se representa en rojo. c) Octámero de Lrp. Los monómeros A, B, C, D, E, F, G y H se muestran en amarillo, morado, rosa, verde, azul, rojo, naranja y gris, respectivamente. Tomado de De los Ríos y Perona, 2007.



Basados en los niveles de Lrp y el porcentaje encontrado libre, se estima que de 400 a 500 octámeros se encuentren unidos al ADN y son capaces de modular la transcripción en medios ricos y mínimos en nutrientes (Kroner *et al.*, 2018).

La proteína Lrp controla la transcripción de genes que codifican para proteínas involucradas en la virulencia bacteriana, pudiendo actuar como activador o represor de la expresión genética. En *S. enterica* serotipo Typhimurium se reportó que Lrp actúa como activador para el gen *fimZ*, el cual codifica para un regulador de la fimbria tipo 1 (Baek *et al.*, 2011). En *C. difficile*, Lrp actúa como activador de los genes *tcdA* y *tcdB*, los cuales codifican para las toxinas de dicho microorganismo (Chen *et al.*, 2019).

En *E. coli* K-12, se reportó que Lrp actúa como represor del gen *fliC*, el cual codifica para la flagelina, proteína principal del flagelo (Kroner *et al.*, 2019). Recientemente, se demostró que en *S. enterica* serotipo Typhi, Lrp actúa como represor indirecto de los genes *ompC* y *ompF* los cuales codifican para dos porinas importantes de dicha bacteria (Rebollar-Flores *et al.*, 2020).

Hasta el momento, solo hay evidencia de un estudio relacionado con la regulación de la transcripción de los genes involucrados en la biosíntesis de la toxina TV de *K. oxytoca*. En dicho estudio, se demostró que la proteína reguladora de AMP cíclico (CRP) activa directamente la transcripción de los operones *aroX* y NRPS. Por lo tanto, al mutar el gen que codifica para CRP disminuyó la citotoxicidad de *K. oxytoca* sobre células HeLa debido a una disminución en la producción de la toxina TV (Rodríguez-Valverde *et al.*, 2021).

Ya que solo existe un reporte relacionado con la regulación de la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de la toxina TV de *K. oxytoca*, en este trabajo se analizó el efecto regulador de la proteína Lrp, otro regulador transcripcional global, en la expresión de los genes *aroX* y *npsA*, los cuales son el primer gen de los dos operones involucrados en la síntesis de la toxina TV en *K. oxytoca*.



K. oxytoca es una bacteria que en los últimos años ha adquirido relevancia clínica debido a que se han reportado cepas productoras de una citotoxina llamada tilivalina, la cual produce una colitis hemorrágica asociada a antibióticos.

La proteína reguladora Lrp controla la transcripción de genes que codifican para factores de virulencia e islas de patogenicidad en otras bacterias; sin embargo, no ha sido reportado el papel regulador de Lrp en la expresión de los genes implicados en la producción de TV. Por lo tanto, este estudio contribuirá a entender los mecanismos moleculares para investigaciones aplicadas dirigidas hacia el diseño de fármacos o vacunas para la prevención y el tratamiento de la CHAA.



V. Justificación

K. oxytoca es una bacteria que en los últimos años ha adquirido relevancia clínica debido a que se han reportado cepas productoras de una citotoxina llamada tilivalina, la cual produce una colitis hemorrágica asociada a antibióticos.

La proteína reguladora Lrp controla la transcripción de genes que codifican para factores de virulencia e islas de patogenicidad en otras bacterias; sin embargo, no ha sido reportado el papel regulador de Lrp en la expresión de los genes implicados en la producción de TV. Por lo tanto, este estudio contribuirá a entender los mecanismos moleculares para investigaciones aplicadas dirigidas hacia el diseño de fármacos o vacunas para la prevención y el tratamiento de la CHAA.

VI. Hipótesis

Si la proteína Lrp regula la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de la toxina tilivalina de *K. oxytoca*, entonces al mutar el gen *lrp* se producirá una modificación en la expresión de dichos genes.



VII. Objetivo general

Determinar el papel de la proteína Lrp en la regulación de los genes involucrados en la síntesis de la toxina tilivalina de *K. oxytoca*.

VIII. Objetivos específicos

- I. Generar la cepa mutante en el gen *Irp* de *K. oxytoca*.
- II. Cuantificar la expresión de los genes involucrados en la síntesis de la toxina tilivalina en las cepas silvestre y mutante en el gen *Irp* de *K. oxytoca*.
- III. Obtener la proteína Lrp recombinante y realizar ensayos para determinar si dicha proteína se une sobre la región reguladora de los genes *aroX* y *npsA*.
- IV. Determinar *in silico* los posibles sitios de unión de Lrp sobre la región reguladora de los genes *aroX* y *npsA*.
- V. Identificar *in silico* los probables promotores de los genes *aroX* y *npsA*.



IX. Materiales y Métodos

9.1 Material biológico

Se utilizó la cepa toxigénica de *K. oxytoca* MIT 09-7231 la cual fue aislada de un tumor intestinal de un ratón BALB/c (Darby *et al.*, 2014). La cepa fue donada por el Dr. James Fox de la División de Medicina Comparativa del Instituto Tecnológico de Massachusetts, Estados Unidos de América y se encuentra secuenciada y anotada en el repositorio NCBI con la identificación de Biomuestra SAMN00254032 y contiene completa la isla de patogenicidad asociada a la tilivalina. En México, dicha cepa, se caracterizó por medio de pruebas bioquímicas en el equipo Vitek-2 (bioMérieux) y molecularmente por medio de la amplificación por PCR del gen *pehX*, el cual es específico de la especie *oxytoca* dentro del género *Klebsiella* (Kovtunovych *et al.*, 2003). La cepa es resistente a penicilinas y sensible a quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas, fenicoles, sulfas y macrólidos de acuerdo con los resultados obtenidos después de realizar un antibiograma en el equipo Vitek-2 (bioMérieux).

9.2 Medios de cultivo

Los cultivos bacterianos se realizaron en medio Luria-Bertani LB (Bioxon), el cual contiene triptona (1.0%), extracto de levadura (0.5%) y cloruro de sodio (1.0%), y también en medio mínimo N (MM-N) (Pérez y Groisman, 2007), el cual contiene KCl (5 mM), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (7.5 mM), K_2SO_4 (0.5 mM), KH_2PO_4 (1 mM), TRIS-HCl (100 mM), glicerol (0.5%), casaminoácidos (0.1%) y MgCl_2 (10mM). Una vez preparados, los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C a 15 lb/in² de presión por 15 min.

9.3 Antibióticos

Cuando fue necesario, los medios de cultivo se suplementaron con antibióticos. Éstos se añadieron al medio estéril a partir de una solución concentrada conservada a -20°C con base en las instrucciones de Sambrock y colaboradores (1989). La concentración final de los antibióticos utilizados fue: ampicilina 200 µg/mL, kanamicina 50 µg/mL y tetraciclina 12 µg/mL.



9.4 Equipo de laboratorio

- Autoclave Tuttnaver
- Agitador orbital UNICO
- Agitador Thermo Scientific
- Balanza analítica AES 200
- Cámara para electroforesis BIO-RAD
- Campana de flujo laminar NUAIR clase II tipo A/B3
- Centrífuga Hettich Rotanta 460
- Centrífuga DRAGON LAB
- Centrífuga Thermo Scientific
- Congelador -20 °C Thermo Scientific
- Ultracongelador -70 °C Thermo Scientific Elite Plus
- Espectrofotómetro UNICO 1 100-RS
- Fotodocumentador QUANTUM
- Fuente de poder BIO-RAD
- Horno de microondas PANASONIC
- Incubadora de laboratorio Labnet
- Incubadora orbital INO 650 M
- NanoDrop 1000 Thermo Scientific
- Parrilla Thermo Scientific Cimarec
- Potenciómetro BIO-RAD
- Refrigerador 4 °C LG
- Refrigerador 4 °C LABLINE
- Sistema de purificación de agua PureLab ELGA
- Termociclador Mastercycler nexus gradient eppendorf
- Termociclador de tiempo real Light cycler 480 ROCHE 2
- Termomezclador F. 2.0 eppendorf
- Termomezclador F 1.5 eppendorf
- Vórtex Genie 2 Fisher
- Vórtex Heathrow Scientific

9.5 Generación de la cepa mutante Δlrp de *K. oxytoca*

A partir de la cepa silvestre (WT) se generó la cepa Δlrp reemplazando el gen *lrp* por un gen de resistencia a kanamicina, el cual previamente se amplificó por PCR, utilizando oligonucleótidos que contienen secuencias homólogas del gen a mutar en el extremo 5' (Tabla I).

Debido a la característica de los oligonucleótidos, tales secuencias homólogas permitieron la obtención de un amplicón flanqueado por los extremos de la región codificante del gen *lrp*, lo cual permitió la posterior recombinación homóloga de dicho amplicón y el gen *lrp*, mediante la recombinasa lambda-Red (Datsenko y Wanner, 2000).

Tabla I. Secuencia de los oligonucleótidos para la mutagénesis del gen *lrp* de *K. oxytoca*

| Oligonucleótido | Secuencia (5'→3') | Referencia |
|------------------|---|--------------|
| <i>lrp</i> -H1P1 | <u>ATTTTTCTCCTGAGGCGCCCAATGTTAGAT</u> <u>AAAATTGATCGTAAGTGTAGGCTGGAGCTG</u> CTTCG | Este trabajo |
| <i>lrp</i> -H2P2 | <u>AATTCGTAGCGGCTGCTGCCGTTAATCAAT</u> <u>AGGCAAGGCTGTGGTCATATGAATATCCTC</u> CTTAG | Este trabajo |

*Se indican subrayadas las secuencias homólogas al gen *lrp* de *K. oxytoca*

El procedimiento para la mutagénesis se describe a continuación:

a) Amplificación del gen de resistencia a kanamicina

El gen de resistencia a kanamicina del plásmido pKD4 se amplificó utilizando oligonucleótidos que en su extremo 5' contenían secuencias homólogas (de 45 nucleótidos) al gen *lrp* (H1 y H2), más las secuencias correspondientes a los extremos flanqueantes (de 20 nucleótidos) al gen de resistencia a la kanamicina, en el extremo 3', los cuales se denominan P1 y P2 (Figura 10).



Figura 10. Amplificación del gen de resistencia a kanamicina. Se amplificó por PCR el gen de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4. H1 y H2 se refieren a las regiones homólogas del gen *lrp* de *K. oxytoca* y P1 y P2 corresponden a las regiones homólogas al gen de resistencia a la kanamicina del plásmido pKD4. Adaptado de Datsenko y Wanner, 2000.

Los oligonucleótidos tuvieron un tamaño de 65 nucleótidos. De esta forma, al amplificar el gen de resistencia a kanamicina del plásmido pKD4, se generó un fragmento que contiene la resistencia al antibiótico y las secuencias homólogas al gen que se pretende mutar (*lrp*) en ambos extremos.

Para la PCR se utilizó una mezcla de reacción de 100 μ L compuesta de: 5.0 μ L del oligonucleótido *lrp*-H1P1, 5.0 μ L del oligonucleótido *lrp*-H2P2 a una concentración de 10 μ M (Bioneer), 2.0 μ L de ADN genómico a una concentración de 100 ng/ μ L, 38 μ L de agua estéril libre de nucleasas y 50 μ L de Phusion Máster Mix (ThermoScientific), la cual contiene 1 U de la enzima Phusion ADN polimerasa, amortiguador 10X (Tris-HCl 200 mM y KCl 500 mM, pH = 8.4), MgCl₂ (25 mM) y dNTPs (10 mM). La mezcla de reacción se realizó por duplicado.

Los tubos con la mezcla de reacción se colocaron en el termociclador Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf); la amplificación consistió de un ciclo inicial de desnaturalización a 98 °C por 10 s, seguido de 30 ciclos con las siguientes condiciones: 98 °C por 1 min, 52 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, finalmente un ciclo de extensión a 72 °C por 5 min, al terminar se programó el termociclador para que bajara la temperatura a 4 °C para mantener así los tubos hasta el momento en que estos se retiraran del termociclador. Una vez terminada la reacción se comprobó la amplificación mediante electroforesis a 80 V por 60 min en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio (0.83 μ g/mL), se colocó en cada pozo 5 μ L de producto de PCR y se usó como regulador TAE 1X.

b) Transformación de *K. oxytoca* con el producto de PCR que contiene el gen de resistencia a la kanamicina y las secuencias H1 y H2

La cepa de *K. oxytoca* transformada con el plásmido pKD119 se cultivó en 5 mL de medio LB a temperatura ambiente durante 12 h. Posteriormente, se inoculó 1 mL de dicho cultivo en 20 mL de medio LB suplementado con L-arabinosa a una concentración final de 0.1 % (Sigma) y 12 µg/mL de tetraciclina. Se incubó a temperatura ambiente en agitación por 3 h. Posteriormente, se hicieron electrocompetentes a las células de dicho cultivo de la siguiente manera: el cultivo se enfrió en hielo durante 20 min y se centrifugó a 5,000 x *g* durante 15 min. Se decantó el sobrenadante y el paquete celular se lavó cuatro veces con 1 mL de glicerol al 10 %, centrifugando, cada vez, a 8,000 x *g* a 4 °C durante 5 min y decantando el sobrenadante. Las células se mantuvieron en hielo hasta el momento de la electroporación. A continuación, se procedió a electroporar 80 µL de células competentes con 500 ng del producto de PCR obtenido en el paso anterior utilizando el electroporador Micropulser (Bio-Rad), con las siguientes condiciones de electroporación: modo de 2.5 kV, resistencia de alto voltaje, voltaje de la descarga de 2 kV y duración del pulso de 5 ms. Una vez sometidas al pulso eléctrico, a las células se les adicionó 1 mL de medio LB fresco y se incubaron a 30°C durante 3 h para permitir la recombinación homóloga y el intercambio del gen de resistencia a la kanamicina por el gen *lrp* (Figura 11).

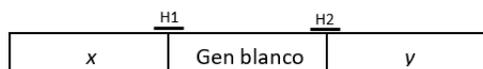


Figura 11. Transformación de *K. oxytoca* conteniendo el pKD119 con el fragmento de PCR. Se transformó con el fragmento de PCR obtenido en el paso anterior, se llevó a cabo la recombinación homóloga e intercambio del gen blanco por el gen de resistencia a kanamicina que contiene secuencias homólogas a los extremos del gen *lrp*. H1 y H2 se refieren a las regiones homólogas del gen blanco. Adaptado de Datsenko y Wanner, 2000.

La selección de las mutantes se realizó sembrando 200 µL del cultivo anterior en agar LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL) y ampicilina (200 µg/mL). Las placas se incubaron a 42 °C por 24 h. En este paso se perdió el plásmido pKD119 debido a que es termosensible.

Las posibles colonias mutantes se sembraron por estría lineal en agar LB con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y en agar LB con tetraciclina (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 18 h. Posteriormente, para confirmar la pérdida del plásmido pKD119, se seleccionaron colonias que únicamente crecieron en el agar LB con kanamicina. Se extrajo ADN de las colonias candidatas como se indica a continuación: una asada de la colonia se resuspendió en 50 μL de agua estéril libre de nucleasas y se incubó en el thermomixer (Eppendorf) a 99 $^{\circ}\text{C}$ en agitación de 300 x g durante 20 min para lisar la pared celular. Una vez pasado el tiempo de incubación, los lisados bacterianos se centrifugaron a 16,000 x g por 5 min y se recolectaron 30 μL del sobrenadante a microtubos nuevos. Se cuantificó el ADN en el NanoDrop ONE (ThermoScientific) y se realizaron amplificaciones por PCR con iniciadores flanqueantes al gen *lrp* (Tabla 2) para comprobar la correcta inserción del gen de resistencia al antibiótico.

Tabla II. Secuencia de los oligonucleótidos para comprobar la correcta inserción del gen de resistencia a kanamicina en las cepas mutantes.

| Oligonucleótido | Secuencia (5' \rightarrow 3') | Referencia |
|------------------|---------------------------------|--------------|
| <i>lrp</i> -CM-F | TAGCCTTTCAATTACAATAAAAGGAGT | Este trabajo |
| <i>lrp</i> -CM-R | AATCGCAAGCAGTTAAATCCTGA | Este trabajo |

Para la PCR se utilizó una mezcla de reacción de 10 μL compuesta de: 0.5 μL del oligonucleótido *lrp*-H1P1, 0.5 μL del oligonucleótido *lrp*-H2P2 a una concentración de 10 μM (Bioneer), 0.2 μL de ADN genómico a una concentración de 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 3.8 μL de agua estéril libre de nucleasas y 5 μL de Phusion Máster Mix (ThermoScientific), la cual contiene 1 U de la enzima Phusion ADN polimerasa, amortiguador 10X (Tris-HCl 200 mM y KCl 500 mM, pH = 8.4), MgCl_2 (25 mM) y dNTPs (10 mM). La mezcla de reacción se realizó por duplicado.



Los tubos con la mezcla de reacción se colocaron en el termociclador Mastercycler nexus GSX1 (Eppendorf); la amplificación consistió de un ciclo inicial de desnaturalización a 98 °C por 10 s, seguido de 30 ciclos con las siguientes condiciones: 98 °C por 1 min, 55 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, finalmente un ciclo de extensión a 72 °C por 5 min, al terminar se programó el termociclador para que bajara la temperatura a 4 °C para mantener así los tubos hasta el momento en que estos se retiraran del termociclador. Una vez terminada la reacción se comprobó la amplificación mediante electroforesis a 80 V por 60 min en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio (0.83 µg/mL), se colocó en cada pozo 5 µL de producto de PCR y se usó como amortiguador TAE 1X.

9.6 Curvas de crecimiento

Para determinar diferencias en el crecimiento en las cepas WT y ΔIrp de *K. oxytoca*, se realizaron curvas de crecimiento inoculando 300 µL de un cultivo semilla en LB en 30 mL de MM-N estéril sin y con leucina (100 µg/mL). Cada cultivo se incubó a 37°C en agitación constante de 160 rpm durante 12 h. La absorbancia se midió a una densidad óptica (DO) de 600 nm cada hora hasta completar las 12 h.

9.7 Extracción del ARN total

La extracción del ARN total se realizó a partir de los cultivos en fase estacionaria de crecimiento de las cepas WT y ΔIrp como se describe a continuación:

- a) **Rompimiento celular:** 30 mL de los cultivos se centrifugaron a 8,000 x *g* durante 10 min a temperatura ambiente, se decantaron los sobrenadantes y las pastillas se resuspendieron en 500 µL de regulador de lisis (SDS 20 mM, acetato de sodio 10 mM y EDTA 10 mM). Las bacterias se lisaron en vórtex en 3 ciclos de 30 s de agitación seguido de 30 s de incubación en hielo. Después, los tubos se colocaron en el Thermomixer (Eppendorf) a 65°C en agitación de 200 x *g* durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 18,000 x *g*, a 4 °C durante 10 min y se recuperó el lisado celular en tubos limpios.

- b) Precipitación del ARN:** a cada tubo se le agregó un volumen de etanol absoluto frío, se agitó suavemente y se incubó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Posteriormente, se centrifugó a $18,000 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Se decantó y se adicionó 1 mL de etanol frío al 70 %, se agitó suavemente y se centrifugó a $14,000 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. Se eliminó el etanol y se secó la pastilla. Una vez seca, dicha pastilla se resuspendió en 50 μL de agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC).
- c) Purificación del ARN:** a los tubos del paso anterior se les adicionaron 5 μL de regulador para DNasa y 1 μL de DNasa TURBO 10X (Ambion); posteriormente, se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Pasado el tiempo de incubación, a cada tubo se le adicionaron 5 μL del agente de inactivación de la DNasa y se mezclaron suavemente; se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugaron a $8,000 \times g$ durante 2 min. La fase acuosa, que contenía al ARN, se transfirió a un tubo estéril.

La calidad del ARN se determinó con 3 μL de cada muestra mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, a 100 V por 45 min, adicionado con hipoclorito de sodio al 1 % (condiciones desnaturalizantes) y teñido con bromuro de etidio (0.83 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se utilizó como regulador TAE 1X preparado con agua tratada con DEPC (Aranda *et al.*, 2012). Posteriormente, se cuantificó y se evaluó la pureza de acuerdo con los cocientes de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm, mediante el Nanodrop One (Thermoscientific). Finalmente, el ARN se mantuvo a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

9.8 Obtención de ADNc

La transcripción reversa (RT) se realizó empleando el Kit “First Strand ADNc Synthesis” (ThermoScientific) realizando la siguiente mezcla de reacción en microtubos estériles: 1 μg de ARN total (el volumen necesario a partir de los extractos), 1 μL de iniciadores hexámeros al azar (150 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 4 μL de amortiguador RT 5X, 1 μL de inhibidor de RNasa RiboLock (20 $\text{U}/\mu\text{L}$), 2 μL de una mezcla de dNTP's 10 mM, 2 μL de transcriptasa reversa M-MuIV (100 $\text{U}/\mu\text{L}$) y el volumen necesario de agua libre de nucleasas para llevar a un volumen final de 20 μL .

La mezcla final se agitó suavemente y se sometió a las siguientes temperaturas en el termociclador Nexus (Eppendorf): 25 °C durante 5 min, 42 °C durante 60 min y 70 °C durante 5 min para inactivar a la transcriptasa reversa. La mezcla se colocó en hielo y finalmente se almacenó a -70 °C hasta su uso.

9.9 Amplificación de los genes *aroX*, *npsA* y *rrsH* por PCR en tiempo real

Para realizar la PCR en tiempo real, se empleó el termociclador LightCycler 480 (Roche); utilizando como sistema de detección al fluorocromo SYBR Green I. Las reacciones para los ensayos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en placas de plástico de 96 pozos especiales para el equipo LightCycler 480. La mezcla de reacción para cada pozo consistió en 1.5 µL de agua grado PCR contenida en el *kit* comercial, 1.0 µL de la mezcla de los iniciadores 20 µM, 5.0 µL de “LightCycler 480 SYBR Green I Master” 10X y 2.5 µL de ADNc.

Cada reacción se realizó por triplicado. Con la mezcla de reacción se llenó cada pozo de la placa y se selló con una lámina plástica adherente. Posteriormente, se colocó en el equipo LightCycler 480 (Roche) y se aplicó el siguiente programa: un ciclo a 95 °C durante 5 min, 45 ciclos en las siguientes condiciones: 95 °C durante 10s, 59 °C durante 10 s y 72 °C durante 10 s (en este punto se hizo la medición de la fluorescencia), posteriormente un ciclo en las siguientes condiciones: 95 °C durante 5 s a una velocidad de 4.4 °C/s, 65 °C durante 1 min a una velocidad de 2.2 °C/s y 97 °C durante 5 s (durante esta fase se midió la fluorescencia en forma continua para construir la curva de desnaturalización), y un ciclo final de enfriamiento a 40 °C durante 10 s.

9.10 Determinación de la expresión genética relativa

El método descrito por Livack y Schmittgen (2001) se utilizó para determinar la expresión genética relativa mediante la aplicación de la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando como gen normalizador el *rrsH* (ARNr 16S). La expresión obtenida en la cepa WT se utilizó como control de referencia, con la finalidad de determinar el número de veces que cambió la expresión genética en la cepa Δlrp con respecto a la cepa WT.

9.11 Análisis estadístico de los resultados de expresión genética

Con la finalidad de detectar diferencias significativas en la expresión genética de las dos cepas de *K. oxytoca*, se efectuó la prueba estadística de *t* de Student, de tipo no pareada y de dos colas empleando para ello el programa estadístico *GraphPad PRISM 7.0*. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

9.12 Sobreexpresión, purificación y diálisis de la proteína Lrp

Para determinar si la proteína Lrp se unía sobre la región reguladora intergénica de *aroX* y *npsA*, la proteína His₆-Lrp recombinante se sobre-expresó en *E. coli* BL21, se purificó y dializó.

9.12.1 Sobreexpresión de la proteína Lrp

La cepa de *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pT6-Lrp (Medina-Aparicio *et al.*, 2011) se cultivó en 5 mL de medio LB a 37 °C con agitación durante 16 h. Se inocularon 2.5 mL del cultivo en 250 mL de medio LB fresco adicionado con tetraciclina (12 µg/ml) y se incubó a 37°C hasta una DO_{600nm} de 0.5 (~4 h); posteriormente, se agregó arabinosa a una concentración final de 0.1 % y el cultivo se incubó a 37 °C por 3 h adicionales.

9.12.2 Purificación de la proteína Lrp

El cultivo bacteriano obtenido se fraccionó en cinco tubos de 50 mL y se centrifugó a 2500 x *g* por 10 min. Posteriormente, cada pastilla bacteriana se resuspendió en 5 mL de PBS-urea 8 M, se mezcló en vórtex y se juntó en un solo tubo para ser lisada por sonicación. El proceso de sonicación consistió en pulsos de 50 % de amplitud durante 1 min seguidos de 1 min de incubación en hielo por 20 min, este proceso se repitió de manera consecutiva hasta la clarificación del medio de cultivo. Al terminar la sonicación, la muestra se centrifugó a 2500 x *g* a 4 °C por 30 min. El sobrenadante se recuperó y se filtró a través de una unidad de filtración de 0.22 µm (Merck Millipore). A continuación, se agregaron 2 mL de resina agarosa-níquel (Qiagen) en una columna de polipropileno para purificación de la proteína. Después, la resina fue pre-equilibrada con 10 mL de PBS urea 8 M y se agregó el extracto total proteico. La resina se lavó con 200 mL de PBS-imidazol 50 mM y finalmente

las fracciones se eluyeron con 5 mL de PBS-imidazol 500 mM. Las diferentes fracciones se analizaron por electroforesis de proteínas.

9.12.3 Diálisis de la proteína Lrp

La proteína purificada se dializó en una membrana de celulosa (Sigma), empleando un amortiguador compuesto por Tris-HCl (20 mM, KCl (50 mM), ditiotreitól (1 mM) y glicerol al 10 %. La membrana con la proteína se selló perfectamente y se mantuvo en agitación con el tampón durante 2 h. Pasado este tiempo, la proteína dializada se transfirió a un tubo de 10 mL para su posterior análisis por electroforesis.

9.13 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) de la proteína Lrp recombinante

Para el análisis de la proteína Lrp recombinante (His₆-Lrp) se realizó un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 15 %. Dicho gel constó de dos fracciones, el gel concentrador (fracción superior) y el gel separador (fracción inferior). Para el gel separador, la mezcla de los reactivos se realizó en un tubo cónico de 50 mL (Tabla III). La solución se agregó en el espacio entre los vidrios hasta que llegó a tres cuartas partes de su contenido y se colocó etanol al 70 % en la parte superior para desplazar todo tipo de burbujas que se pudieran formar. Para el gel concentrador, la mezcla se realizó en un tubo cónico de 15 mL (Tabla 3). El etanol que se encontraba en la parte superior del gel separador se desechó y la mezcla del gel separador se agregó sobre la parte superior del gel e inmediatamente después se colocó un peine para 10 pozos. A continuación, se colocaron 30 µL de la proteína purificada y 10 µL de un amortiguador de proteínas 4 X (Tris-HCl 1M a pH 6.8, SDS al 4 %, azul de bromofenol al 0.1 % y glicerol al 40 %) en microtubos de 0.6 mL. La mezcla se calentó a 95 °C por 5 min y se colocaron 40 µL en cada pozo del gel. Se utilizó el marcador de peso molecular “PageRuler Prestained Protein Ladder” (Thermo Scientific). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 2 h y se utilizó como amortiguador de corrida Tris-Glicina-SDS 1X. Después, el gel se tiñó con azul de coomasie (Sigma) y se lavó con agua hasta observar las bandas correspondientes a las proteínas. Para verificar la purificación de la proteína Lrp recombinante, se comparó el peso de la banda correspondiente a la proteína

purificada obtenida con el marcador de peso molecular. Finalmente, se determinó la concentración de la proteína Lrp recombinante mediante el método de Bradford utilizando el kit comercial “Bradford Protein Assay” (Thermo Scientific).

Tabla III. Volúmenes utilizados para la preparación del gel de poliacrilamida al 15 %

| Gel separador | |
|---------------------------------------|---------|
| Componentes | Volumen |
| Acrilamida/Bisacrilamida 30 % / 80 % | 7.5 mL |
| Tris HCl/SDS 4 X (pH 8.8) | 3.7 mL |
| APS 10% | 50 µL |
| TEMED | 10 µL |
| Agua | 3.75 µL |
| Gel concentrador | |
| Acrilamida/Bisacrilamida 30 % / 0.8 % | 650 µL |
| Tris HCl/SDS 4 X (pH 8.8) | 1.25 mL |
| APS 10% | 25 µL |
| TEMED | 5 µL |
| Agua | 3.05 mL |

9.14 Ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA)

Estos ensayos se realizaron como previamente se reportó por el grupo de trabajo (Rodríguez-Valverde *et al.*, 2021). Se utilizaron los fragmentos de la región reguladora intergénica de los genes *aroX* y *npsA*, de la región reguladora del gen *ilvI* (control positivo) y del gen *fbpA* (control negativo), los cuales se amplificaron por PCR utilizando los iniciadores que se indican en la Tabla IV diseñados en el laboratorio. Éstos, posteriormente se purificaron con columnas de afinidad

(Favorgen). Los fragmentos *aroX-npsA*, *ilvI* y *fbpA* purificados, se incubaron con concentraciones crecientes de la proteína recombinante His₆-Lrp dializada (0, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 μM), L-Leucina (7 mM) (Montaguth *et al.*, 2019), H₂O y un buffer de unión [Tris-HCl pH 7.5 (200 mM), KCl (500 mM), ditiotretol (10 mM) y glicerol al 50 %], a temperatura ambiente durante 20 min. Se preparó un gel de poliacrilamida nativo al 6 % como se indica a continuación: 3 mL de acrilamida/bisacrilamida 30 % / 0.8 %, 1.5 mL de TBE 5X, 10.52 mL de H₂O, 100 μL de APS 10% y 16 μL de TEMED. La mezcla de reacción ADN-proteína se sometió a una electroforesis usando 100 V a temperatura ambiente por 90 min, usando como amortiguador TBE 0.5 X. Posteriormente, el gel de poliacrilamida fue teñido con una solución de bromuro de etidio (10 mg/L) durante 10 s y se analizó en un equipo de transiluminación de UV.

Tabla IV. Secuencia de los oligonucleótidos para amplificar por PCR las secuencias reguladoras de los genes a analizar en los EMSA.

| Oligonucleótido | Secuencia (5'→3') | Referencia |
|--------------------------|------------------------|---|
| <i>aroX-npsA</i> -EMSA-F | TCGCTCCAGAACGGCTGTT | Rodríguez-Valverde <i>et al.</i> , 2021 |
| <i>aroX-npsA</i> -EMSA-R | CTGAATGCGTCATCACTCTCTC | Rodríguez-Valverde <i>et al.</i> , 2021 |
| <i>ilvI</i> -EMSA-F | CGTTGAAGGTCAATAGCCGT | Este trabajo |
| <i>ilvI</i> -EMSA-R | ATCTCCATGGTTTGCCTCCC | Este trabajo |
| <i>fbpA</i> -EMSA-F | TTCCTGACCAGCGAGCTGCCG | Ares <i>et al.</i> , 2019 |
| <i>fbpA</i> -EMSA-F | CCCCAGTACTCCCAGCTGTGC | Ares <i>et al.</i> , 2019 |

9.15 Comparación *in silico* de la secuencia nucleotídica del gen *lrp* de *K. oxytoca* con otras bacterias

A la secuencia de nucleótidos del gen *lrp* de *K. oxytoca* se le realizó un alineamiento con el servidor blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) para observar el porcentaje de identidad entre las secuencias nucleotídicas de especies del mismo género y entre diferentes bacterias.

9.16 Comparación *in silico* de la proteína Lrp de *K. oxytoca* con otras Lrp.

La secuencia de aminoácidos de la proteína Lrp de *K. oxytoca* fue modelada tridimensionalmente utilizando el software Phyre2 (Kelley y Sternberg, 2009) (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>). Por otro lado, se obtuvo el modelo cristalográfico de la base de datos del RCB PDB (<http://www.rcbs.org>) para hacer la comparación *in silico* entre ambas proteínas; Lrp de *K. oxytoca* y *E. coli* K-12 (PDB ID: 2GQQ).

El análisis de las moléculas fue realizado por medio de Chimera (UCSF, 2018) haciendo una superposición de estructuras. Se utilizó también el software libre Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para llevar a cabo un alineamiento múltiple de secuencias para identificar las secuencias altamente conservadas. El análisis de comparación entre las estructuras 3D de las proteínas se realizó utilizando el servidor DALI (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/index.html#tabs-2>) (Holm y Laakso, 2016) obteniendo el porcentaje de similitud entre las estructuras secundarias y la Desviación Cuadrática Media (RMSD) del alineamiento de las estructuras.

9.17 Modelación de ligando y Docking molecular

Se escogió como modelo de ligando la molécula de ADN de doble cadena de la región intergénica de *aroX* y *npsA* obtenida de la base de datos del NCBI (<https://ncbi.nlm.nih.gov/>). La estructura se modeló y se refinó utilizando una minimización con el programa Avogadro (Marcus *et al.*, 2012).



Se obtuvo el dímero de Lrp para *K. oxytoca* por medio de un docking entre la proteína utilizando el servidor Hdock (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) (Yan *et al.*, 2020).

Se realizó una simulación para el ligando ADN (*aroX-npsA*) con el modelo tridimensional de la proteína Lrp utilizando Hdock. Se guardó la mejor pose para cada uno de los modelos seleccionados.

9.18 Identificación *in silico* de posibles promotores para los genes *aroX* y *npsA*

Las secuencias de nucleótidos correspondientes a las regiones reguladoras de los genes *aroX* y *npsA* de *K. oxytoca* MIT 09-7231 se descargaron en formato FASTA del servidor “NCBI: National Center for Biotechnology Information” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y se analizaron mediante la herramienta bioinformática en línea “Neural Network Promoter Prediction” (https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) para la búsqueda de posibles secuencias promotoras sobre las regiones reguladoras de los genes *aroX* y *npsA*.

X. Resultados y discusión

10.1 Caracterización de la cepa Δlrp

El ADN extraído tanto de la cepa silvestre, como de dos cepas candidatas mutantes en el gen *lrp* se utilizó para realizar la PCR utilizando iniciadores flanqueantes denominados CM los cuales se unen 50 pb río arriba y 50 pb río abajo del gen que se mutó.

En la Figura 12 se observan los fragmentos amplificados por PCR del gen de resistencia a kanamicina en las cepas Δlrp y del gen *lrp* en la cepa silvestre. En el carril 1 se observa el corrimiento electroforético del marcador de tamaño molecular 1kb Plus (Thermo Scientific). En los carriles 2 y 3 se cargaron los productos de PCR al utilizar el ADN extraído de las colonias candidatas mutantes en el gen *lrp* en la PCR y se observaron amplicones de 1600 pb. En el carril 5 se observa el amplicón obtenido al amplificar el ADN de la cepa silvestre con los mismos oligonucleótidos. Los amplicones de 1600 pb correspondientes al tamaño del gen de resistencia a kanamicina (1500 pb) más 50 pb río arriba y 50 pb río abajo del gen *lrp*, confirmaron la delección del gen *lrp* y la correcta inserción del gen de resistencia a la kanamicina en las dos colonias candidatas mutantes. El amplicón obtenido al utilizar el ADN de la cepa silvestre fue de 559 pb correspondiente al tamaño del gen *lrp* (459 pb) más 50 pb río arriba y 50 pb río abajo relativos a las regiones amplificadas flanqueantes del gen.

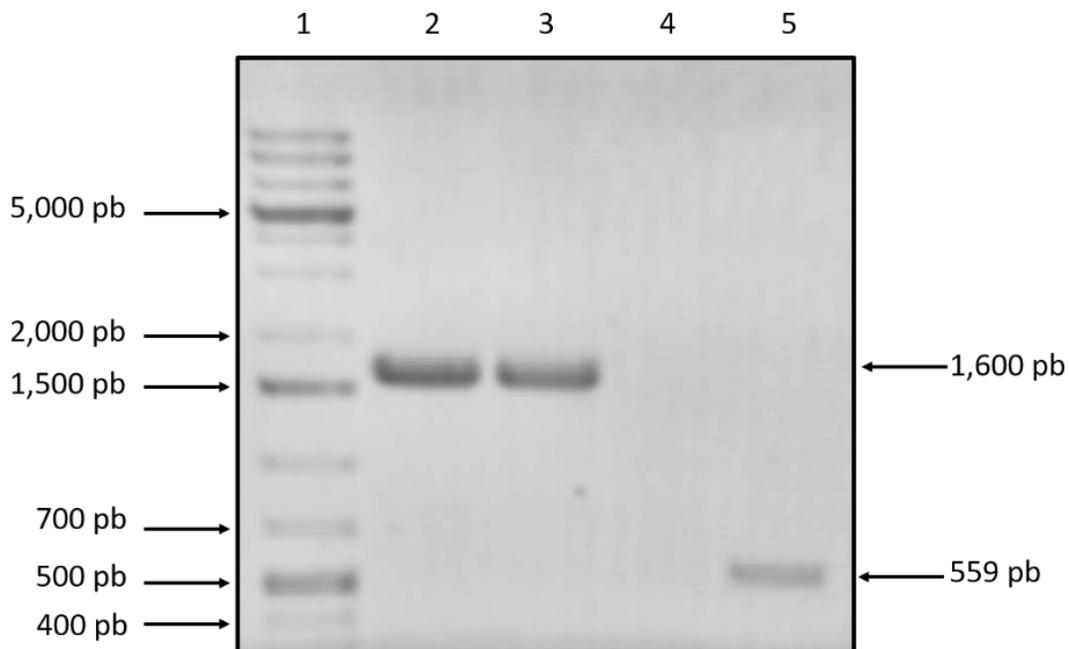


Figura 12. Caracterización de las cepas mutantes Δlrp candidatas mediante la amplificación por PCR del gen de resistencia a la kanamicina y del gen *lrp* de *K. oxytoca*. Carril 1, Marcador de tamaño molecular 1 Kb plus (Thermo Scientific); carriles 2 y 3 amplicón correspondiente al gen de resistencia a kanamicina en las cepas Δlrp . Carril 4 vacío. Carril 5 amplicón correspondiente al gen *lrp* en la cepa silvestre de *K. oxytoca* (control negativo).

10.2 Cinéticas de crecimiento

Se graficó la absorbancia de los cultivos en MM-N sin y con leucina a 37 °C de las cepas silvestre y mutante Δlrp durante 12 h. En el MM-N sin leucina, la cepa silvestre alcanzó la fase logarítmica media después de las 5 h y la fase estacionaria temprana después de las 8 h. En contraste, la cepa mutante Δlrp alcanzó la fase logarítmica media después de las 6 h y la fase estacionaria temprana después de las 9 h (Figura 13A). En el MM-N con leucina, la cepa silvestre alcanzó la fase logarítmica media después de las 5 h y la cepa mutante Δlrp después de las 6 h. Ambas cepas, silvestre y mutante Δlrp alcanzaron la fase estacionaria temprana a las 8 h (Figura 13B).

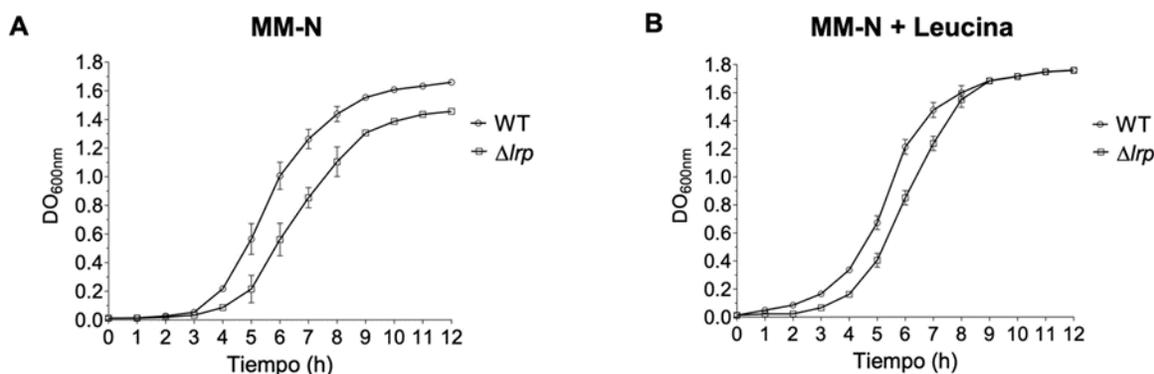


Figura 13. Cinéticas de crecimiento de las cepas de *K. oxytoca*. Las cepas silvestre y mutante Δlrp se cultivaron en MM-N sin y con leucina y se incubaron a 37°C en agitación por 12 h. A) Cinéticas de crecimiento en MM-N sin leucina B) Cinéticas de crecimiento en MM-N con leucina (100 mg/mL). La absorbancia se midió cada hora a una longitud de onda de 600 nm. Las barras de error indican la desviación estándar de tres eventos independientes.

La ausencia de Lrp afectó el crecimiento de *K. oxytoca* en MM-N sin leucina en ambas fases de crecimiento, logarítmica y estacionaria. Esto coincidió con un reporte en *C. difficile* en donde también, la ausencia Lrp afectó su crecimiento en ambas fases de crecimiento en medio mínimo CD (Chen *et al.*, 2019). Cuando al MM-N, se le adicionó leucina, la ausencia de Lrp afectó el crecimiento de *K. oxytoca* solo en la fase logarítmica. Este efecto podría deberse a que la proteína Lrp regula positivamente a los genes involucrados en la biosíntesis de la leucina (Shimada *et al.*, 2015); por lo tanto, en ausencia de Lrp no hay la cantidad suficiente de leucina necesaria para el crecimiento óptimo bacteriano. En contraste, cuando al medio de cultivo se le adicionó leucina, la bacteria pudo utilizar a dicho aminoácido como fuente de nitrógeno y pudo crecer como la silvestre en la fase estacionaria de crecimiento.

10.3 Extracción de ARN

A partir de cultivos en fase estacionaria de las cepas silvestre y Δlrp se extrajo el ARN total, se purificó y cuantificó obteniendo concentraciones entre 222.0 y 601.7 ng/ μ L y purezas de 1.9 a 2.0 según el cociente de absorción 260/280 nm.

Después de realizar una electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes, se determinó que el ARN extraído de las cepas en estudio presentó una integridad adecuada al observarse con nitidez las bandas correspondientes a los ARN ribosomales 23S y 16S (Figura 14).

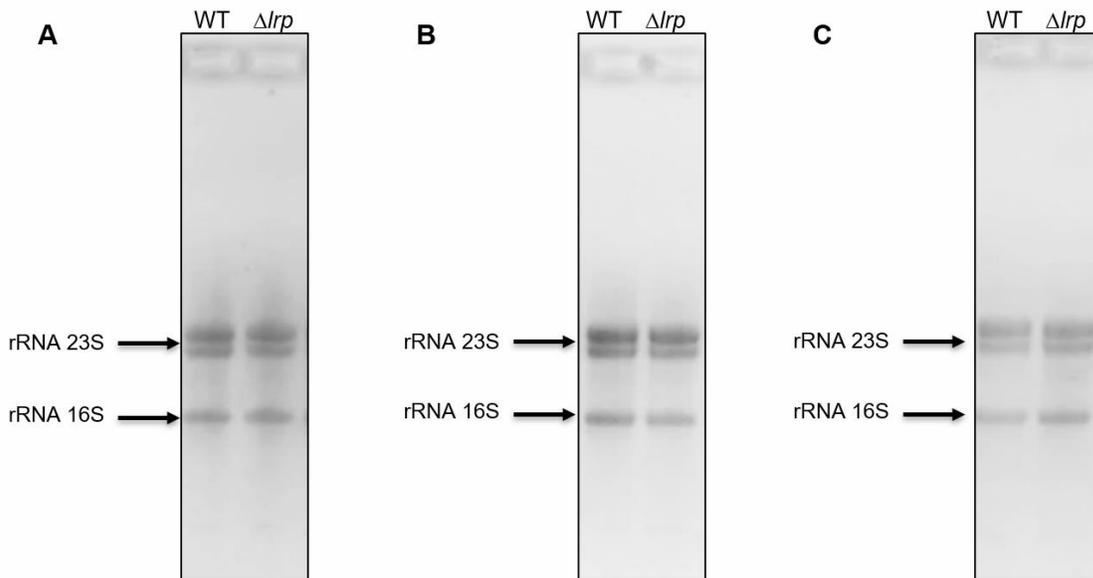


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes del ARN ribosomal (23S y 16S). En la figura, las imágenes A, B y C muestran la integridad del ARN después de la extracción y purificación, realizado en tres eventos independientes correspondiendo la figura A al primer evento, la figura B al segundo evento y la figura C al tercer evento. Todos los eventos fueron realizados bajo las mismas condiciones utilizando MM-N.

Los experimentos en donde se utiliza el ARN requieren de una alta calidad de éste y que no se encuentre degradado. Es prioridad validar la integridad del ARN antes de la síntesis de ADNc. Debido a que las técnicas utilizadas generalmente requieren de equipos caros para su análisis, varios grupos de investigación se han dedicado a mejorar las técnicas utilizadas con normalidad para poder obtener buenos resultados. En la técnica donde se estudió el uso de hipoclorito de sodio como agente desnaturalizante, se extrajo ARN de células de carcinoma mamario de ratones 4T1.2 y se analizaron mediante electroforesis las muestras en geles de agarosa al 1%, los cuales contenían 20 ng/mL de ARNasa A y diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (0 a 5 % v/v). Se demostró que en presencia de 20 ng/mL de ARNasa A, pero en ausencia de hipoclorito de sodio (0 %) el ARN fue degradado. Sin embargo, la adición de hipoclorito de sodio a partir de una

concentración de 0.5 % evitó la degradación del ARN, ya que se observaron las bandas correspondientes a los ARN ribosomales eucarióticos 28S y 18S (Aranda *et al.*, 2012). Debido a lo anterior, en el grupo de trabajo se ha utilizado esta metodología para el análisis del ARN extraído y ha sido de gran utilidad para determinar la integridad del ARN antes de proceder a la síntesis del ADNc.

En todos los eventos, se observan dos bandas correspondientes al ARNr 23S, esto es debido a que en *K. oxytoca* el ARNr 23S tiene una secuencia de intervención conocida como hélice 25, la cual es escindida por la ARNasa III y se generan dos fragmentos de ARN ribosomal 23S: uno de 2.9 Kb correspondiente a los cuatro operones ribosomales que no tienen la hélice 25 y otro de 2.4 Kb correspondiente a los tres operones que sí la contienen (Wang *et al.*, 2008).

10.4 Expresión del gen normalizador

Los valores de CT del gen *rrsH* en todas las condiciones estudiadas por PCR en tiempo real fueron muy similares, con valores entre 8.64 y 10.26, por lo cual fueron óptimos para aplicarlos en la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ y de esta forma determinar la expresión genética en unidades de expresión relativa.

10.5 Expresión de los genes *aroX* y *npsA*

Se evaluó la expresión genética relativa de los genes *aroX* y *npsA* debido a que son los primeros genes de cada uno de los operones involucrados en la síntesis de la TV. En la Figura 15 se presenta la expresión relativa del gen *aroX* en las cepas silvestre y ΔIrp en ausencia y presencia de leucina en el medio.

Cuando al MM-N se le adicionó leucina (100 $\mu\text{g/ml}$), el nivel de expresión del gen *aroX* en la cepa silvestre incrementó 29.36 veces con respecto al medio sin leucina. En contraste, los niveles de expresión del gen *aroX* en las cepas silvestre y ΔIrp no presentaron diferencias estadísticamente significativas en ausencia o presencia de leucina. El efecto de la mutación en el gen *Irp*, únicamente se observó en presencia de leucina, en donde la expresión de *aroX* disminuyó 31.36 veces en la cepa ΔIrp con respecto a la cepa silvestre.

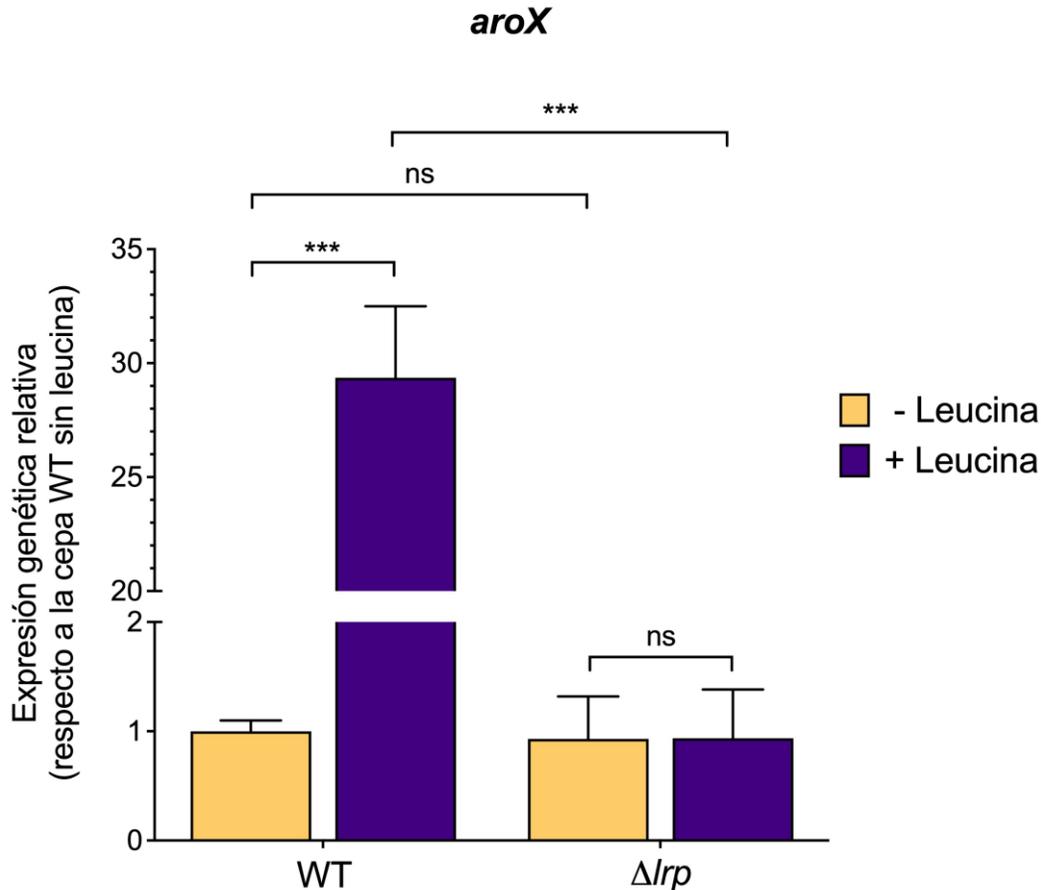


Figura 15. Expresión del gen *aroX* involucrado en la síntesis del precursor químico de la tilivalina. Expresión genética relativa en las cepas cultivadas en MM-N sin y con leucina. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes. *** $p < 0.001$, ns: no significativo estadísticamente de acuerdo con la prueba *t* de student.

El mismo efecto fue observado al evaluar la expresión del gen *npsA* (Figura 16). Es decir, cuando el medio de cultivo carecía de leucina, el nivel de expresión del gen *npsA* en la cepa silvestre incrementó 19.82 veces con respecto al medio sin leucina. En contraste, los niveles de expresión del gen *npsA* en las cepas silvestre y Δlrp no presentaron diferencias estadísticamente significativas en ausencia o presencia de leucina. El efecto de la mutación en el gen *lrp*, únicamente se observó en presencia de leucina, en donde la expresión de *npsA* disminuyó 20.53 veces en la cepa Δlrp con respecto a la cepa silvestre.

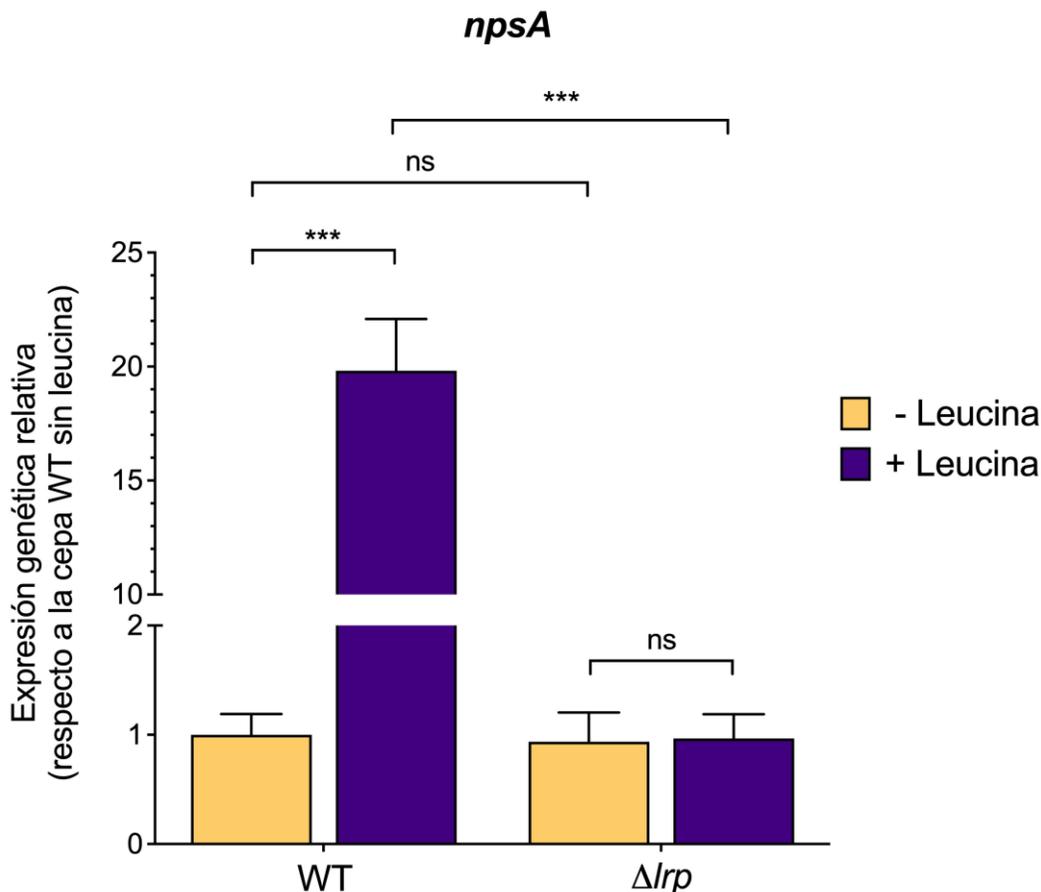


Figura 16. Expresión del gen *npsA* involucrado en la etapa final de la síntesis de tilivalina. Expresión genética relativa en las cepas cultivadas en MM-N sin y con leucina. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes. *** $p < 0.001$, ns: no significativo estadísticamente de acuerdo con la prueba *t* de student.

Estos resultados indican que la proteína Lrp activa la expresión de los genes *aroX* y *npsA* los cuales están involucrados en la biosíntesis de la toxina tilivalina. Además, la actividad reguladora de la proteína Lrp sobre ambos genes es dependiente de la presencia de la leucina. Al disminuir la expresión de los genes *aroX* y *npsA* en la cepa Δlrp se infiere que se disminuirá la citotoxicidad de *K. oxytoca* sobre células epiteliales y consecuentemente se afectará la virulencia de la cepa; por lo tanto, la proteína reguladora Lrp serviría de objeto de estudio como blanco terapéutico o profiláctico para combatir la CHAA.

Los resultados obtenidos hasta el momento concuerdan con estudios previos en donde Lrp actúa como activador transcripcional. Lrp es un regulador transcripcional encontrado en un amplio rango de bacterias. En *E. coli* K-12 regula alrededor del 10% de los genes, actuando como activador o represor. La mayoría de los genes regulados en *E. coli* K-12 se encuentran involucrados en el metabolismo de aminoácidos así como en el transporte de nutrientes y la formación de pilus (Brinkman *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2008; Graveline *et al.*, 2011; Shimada *et al.*, 2015). Además, se ha demostrado que Lrp regula genes de virulencia de algunos patógenos como *Salmonella* Typhimurium (Baek *et al.*, 2009), *Xenorhabdus nematophila* (Cowles *et al.*, 2007; Hussa *et al.*, 2015), *Vibrio cholerae* (Lin *et al.*, 2007) y *Citrobacter rodentium* (Cordone *et al.*, 2011).

En 2017 se reportó que en la cepa Δlrp de *Vibrio vulnificus* se disminuyó la expresión de genes de migración, virulencia y citotoxicidad. A comparación de la cepa silvestre, la cepa Δlrp fue menos capaz de colonizar sitios de infección, también presentó la incapacidad de resistir la fagocitosis por macrófagos ya que la ausencia de la proteína generaba fallos en los mecanismos bactericidas. La regulación de genes involucrados en el transporte de hierro también se afectó y en consecuencia se disminuyó la biosíntesis de vulnibactina, un sideróforo importante de *V. vulnificus*. La disminución en la migración en la cepa Δlrp se debió a un defecto en la quimiotaxis, pero no en la motilidad (Ho *et al.*, 2017).

En 2019 se reportó que en la cepa Δlrp de *S. lincolnensis* se disminuyó la expresión de los genes *lmbA*, *lmbC*, *lmbD*, *lmbK*, *lmbR* y *lmbV* involucrados en la biosíntesis de lincomicina, siendo este estudio la primera evidencia experimental de la regulación directa de Lrp para la biosíntesis de un antibiótico en actinomicetos (Xu *et al.*, 2019).

10.1 Sobreexpresión y purificación de la proteína Lrp

Se obtuvo el extracto total y seis fracciones de la proteína recombinante, las cuales se analizaron en un SDS-PAGE (Figura 17). Se observó una banda de 19.7 kDa en las seis fracciones eluidas, correspondiente al peso molecular de la proteína Lrp más la etiqueta de seis histidinas en su extremo amino (His₆-Lrp).

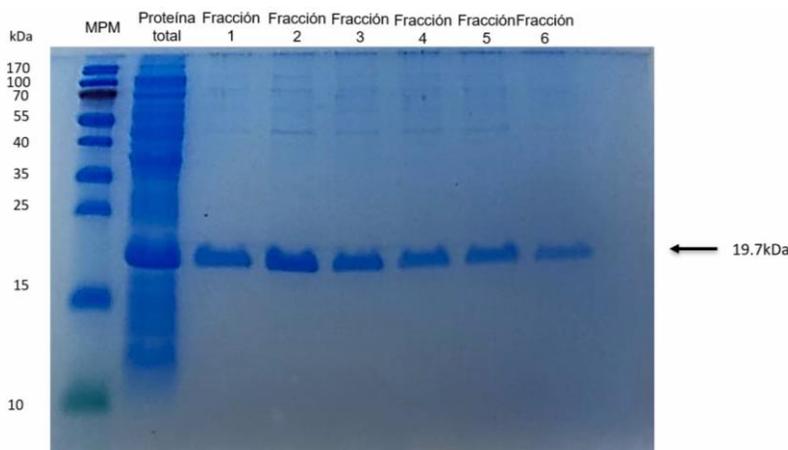


Figura 17. Electroforesis de la proteína recombinante Lrp en gel de poliacrilamida. Se observa en el carril 1 el marcador de peso molecular de Thermo Scientific™ PageRuler™, en el carril 2 el extracto total de la proteína recombinante Lrp, en los carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se observan las fracciones recolectadas a partir de la purificación con la presencia de una banda de 19.7 kDa correspondiente al peso molecular de la proteína His₆-Lrp.

Posteriormente, todas las fracciones de proteína recombinante His₆-Lrp purificadas se juntaron y se sometieron a diálisis por medio de una membrana de celulosa y una solución amortiguadora. La proteína recombinante His₆-Lrp dializada se analizó nuevamente mediante SDS-PAGE (Figura 18), observándose una banda de 19.7kDa. Finalmente, la proteína se cuantificó con el método de Bradford obteniéndose una concentración de 200 µg/mL. Este valor se dividió entre el peso molecular de la proteína recombinante His₆-Lrp para obtener su concentración molar, obteniéndose un resultado de 10.15 µM.

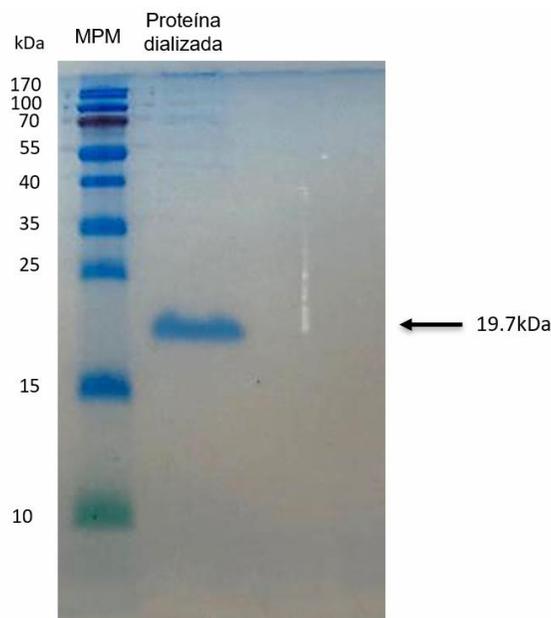


Figura 18. Electroforesis de la proteína Lrp dializada en gel de poliacrilamida. Se observa en el carril 1 el marcador de peso molecular de Thermo Scientific™ PageRuler™, en el carril 2 la proteína Lrp dializada con un peso molecular de 19.7 kDa.

En estudios previos, se ha obtenido esta misma proteína recombinante con la utilización del mismo plásmido (pT6-Lrp) (Medina-Aparicio *et al.*, 2011; Rebollar-Flores *et al.*, 2020).

10.2 Unión de la proteína Lrp a la región intergénica de los genes *aroX* y *npsA*

Se realizaron ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés: “*Electrophoretic Mobility Shift Assay*”) utilizando la proteína recombinante His₆-Lrp y sondas de ADN. Lrp se unió a la región intergénica de los genes *aroX* y *npsA* ya que se observaron la formación de los complejos Lrp-ADN utilizando 0.4 y 0.8 μM de His₆-Lrp. Se utilizaron como controles positivo y negativo a las regiones reguladoras de los genes *ilvI* y *fbpA*, respectivamente (Figura 19). Los resultados indicaron que la proteína Lrp se une a la región reguladora intergénica *aroX-npsA* y por lo tanto el papel activador de Lrp es de manera directa.

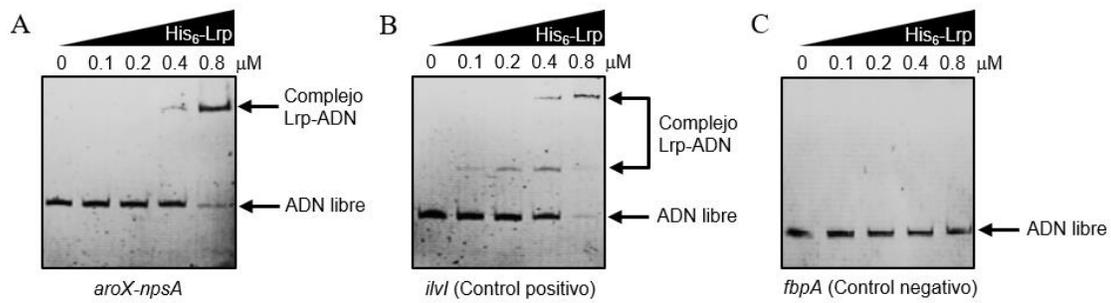


Figura 19. Ensayo de movilidad electroforética muestra la unión de Lrp a la región intergénica de los genes *aroX* y *npsA*. En la imagen A se observa la unión de la proteína Lrp a la región intergénica de los genes *aroX* y *npsA*. En la imagen B y C se utilizaron las regiones reguladoras *ilvI* y *fbpA* como controles positivo y negativo respectivamente. Se colocaron 100 ng de ADN de cada una de las sondas de las regiones reguladoras se mezcló y se incubó con concentraciones crecientes (μM) de la proteína recombinante His₆-Lrp. El gel se tiñó como bromuro de etidio resaltando el ADN libre y la formación de los complejos Lrp-ADN.

Estos resultados coinciden con otros obtenidos previamente en otros grupos de trabajo, en donde se demostró la unión de la proteína Lrp: a la región reguladora del gen *casA* en *Salmonella enterica* serotipo Typhi (Medina-Aparicio et al., 2011), a la región reguladora del gen *fimA* de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (Baek et al., 2011), a la región reguladora del operón LEE1 de *Citrobacter rodentium* (Cordone et al., 2011), a la región reguladora del gen *alaE* de *E. coli* K-12 (Ihara et al., 2017) y a la región reguladora del gen *eamA* en *Pseudomonas aeruginosa* (Modrzejewska et al., 2021).

10.3 Análisis de alineamiento de nucleótidos

Un análisis de alineamiento de nucleótidos nos permite saber la identidad entre especies y géneros de una secuencia específica, en este caso de la proteína Lrp ya que al ser un regulador global se puede encontrar en una gran variedad de microorganismos. La tabla V muestra el porcentaje de identidad obtenido a través de BLASTn para diversas especies de *Klebsiella* y algunas otras bacterias comparándolas con la secuencia de *K. oxytoca* MIT 09-7231. En las tres especies dentro del mismo género se observa que el porcentaje de identidad no es menor al 95.96% y en las otras bacterias el valor más bajo fue de 85%, esto concuerda con

estudios donde se ha reportado que esta proteína se encuentra altamente conservada entre bacterias (Newman and Lin, 1992; Brinkman *et al.*, 2003; Peeters and Charlier, 2010).

Tabla V. Alineamiento de nucleótidos de la proteína Lrp de *K. oxytoca* con diversas bacterias.

| Microorganismo | Porcentaje de identidad |
|------------------------------------|-------------------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 98.38 |
| <i>Klebsiella rhinoscleromatis</i> | 96.00 |
| <i>Klebsiella variicola</i> | 95.96 |
| <i>Salmonella enterica</i> | 87.68 |
| <i>Shigella flexneri</i> | 88.69 |
| <i>Escherichia coli K12</i> | 85.00 |
| <i>Enterococcus gallinarum</i> | 88.69 |
| <i>Enterobacter hormaechei</i> | 90.52 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 91.52 |
| <i>Citrobacter rodentium</i> | 90.30 |

10.4 Análisis de alineamiento de aminoácidos

La proteína Lrp de *E. coli* K.12 es la mejor estudiada por lo que se tomó la decisión de comparar la proteína de *K. oxytoca* con esta (Brinkman *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos en el alineamiento mostraron que 163 aminoácidos de los 164 que conforman a la proteína son idénticos (99.3% de identidad). Solo el aminoácido de la posición 95 de la proteína cambió de serina, en *E. coli*, por treonina, en *K. oxytoca*. Sin embargo, ambos aminoácidos pertenecen al mismo

grupo de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas (polares sin carga), incluso ambos poseen un grupo hidroxilo en su cadena lateral R. Así, ambas proteínas poseen un 100% de similitud (Figura 20).

| | | |
|----------------------------|--|-----|
| KQ235799.1:2328660-2329154 | MVDSKKRPGKDLDRIDRNILNELQKDGRISNVELSKRVGLSPTPCLERVRRLERQGFIQG | 60 |
| D11105.1:462-956 | MVDSKKRPGKDLDRIDRNILNELQKDGRISNVELSKRVGLSPTPCLERVRRLERQGFIQG | 60 |
| | ***** | |
| KQ235799.1:2328660-2329154 | YTALLNPHYLDASLLVFEITLNRGAPDVFEQFNSAVQKLEEIQECHLVSGDFDYLLKTR | 120 |
| D11105.1:462-956 | YTALLNPHYLDASLLVFEITLNRGAPDVFEQFNTAVQKLEEIQECHLVSGDFDYLLKTR | 120 |
| | ***** | |
| KQ235799.1:2328660-2329154 | VPDMSAYRKLLGETLLRPLGVNDTRTYVVMEEVKQSNRLVIKTR | 164 |
| D11105.1:462-956 | VPDMSAYRKLLGETLLRPLGVNDTRTYVVMEEVKQSNRLVIKTR | 164 |
| | ***** | |

Figura 20. Alineamiento múltiple con Clustal Omega. KQ235799.1:2328660-2329154 Lrp *K. oxytoca* MIT 09-7231, D11105.1:462-956 Lrp *E. coli* K-12 (PBD: 2GQQ). Las posiciones idénticas se encuentran marcadas con asterisco, los dos puntos indican que ambos aminoácidos pertenecen al mismo grupo de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas.

La figura 21 muestra la superposición de estructuras utilizando el software Chimera para analizar la similitud por medio de la superposición de las estructuras. El análisis de alineamiento de estructuras tridimensionales utilizando DALI (Holm y Laakso, 2016) mostró que ambas proteínas comparten 99% de similitud en la secuencia de aminoácidos y de similitud en la estructura de la proteína (RMSD= 0 Å).

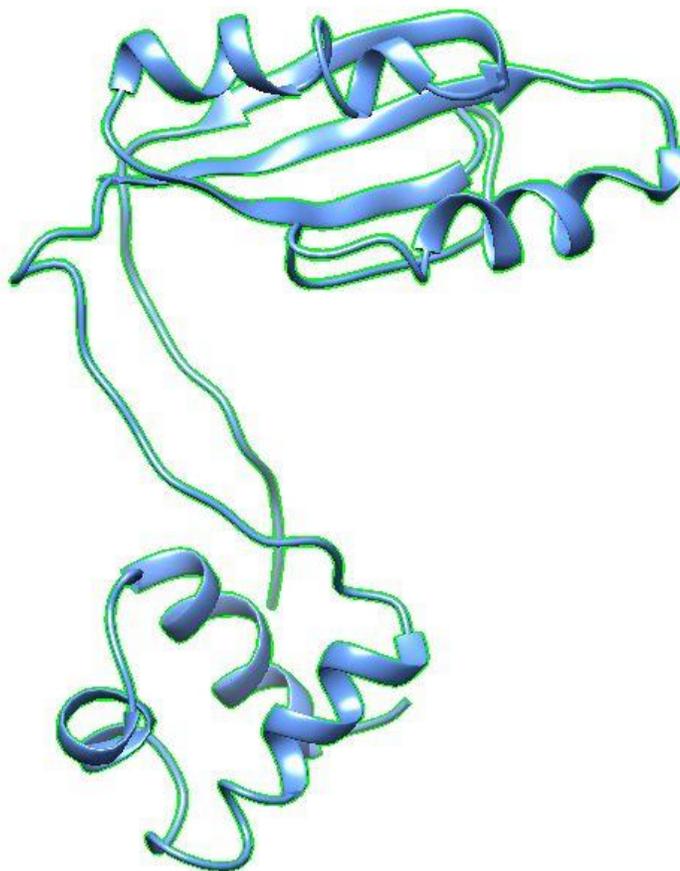


Figura 21. Modelado tridimensional de las proteínas Lrp. Modelo “de cintas” para las proteínas Lrp de *E. coli* K-12 (azul) (PDB: 2GQQ) y Lrp de *K. oxytoca* MIT 09-7231 (verde). Visualizado en Chimera.

Los resultados del alineamiento de aminoácidos mostraron que existe solo un aminoácido que es diferente entre estas proteínas, este se encuentra en la posición 95 de los 164 aminoácidos, para *E. coli* este aminoácido es una treonina y para *K. oxytoca* una serina, ambos aminoácidos pertenecen a la clasificación polares sin carga y poseen un grupo hidroxilo y tienen como diferencia que la treonina posee un carbono más en su estructura. En la figura 22 se observa la posición de este aminoácido en ambas estructuras.

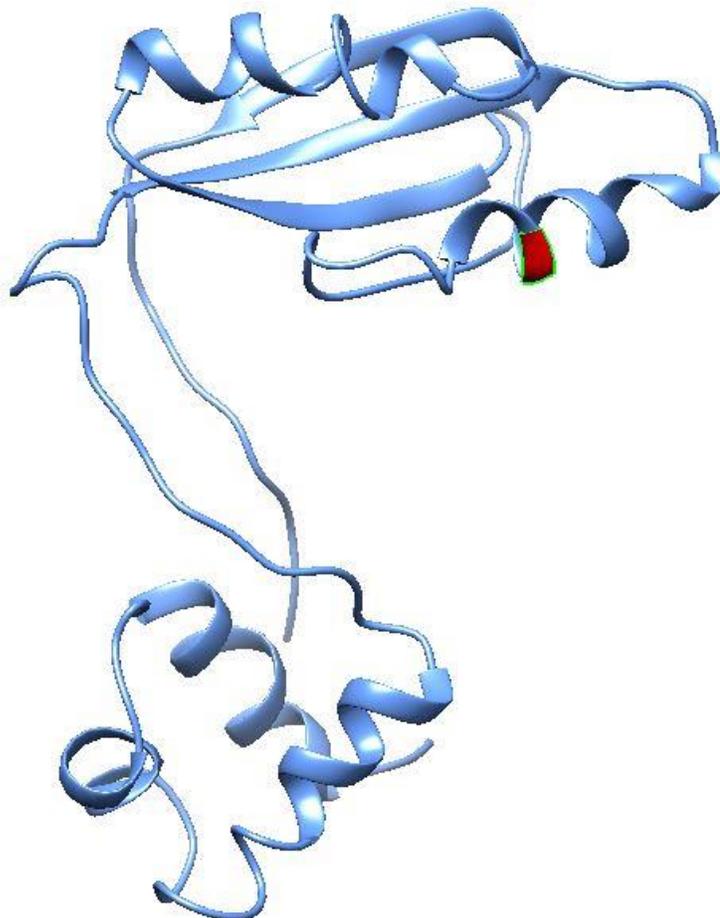


Figura 22. Modelado tridimensional de Lrp. Modelo “de cintas” para Lrp de *E. coli* K-12 (azul) (PDB: 2GQQ). En color rojo se marca la posición 95 correspondiente al aminoácido treonina, el cual representa la única diferencia entre esta proteína y la de *K. oxytoca*. Visualizado en Chimera.

10.5 Docking molecular

Se obtuvieron dos resultados del docking molecular entre la región de ADN *aroX-npsA* y el dímero de Lrp de *K. oxytoca*. El primer modelo que se muestra en las figuras 23 y 24 es la predicción de unión para la regulación de la transcripción del gen *npsA* ya que la interacción se da en la cadena 5' a 3'. El puntaje LG para este docking fue de 3.842 y MaxSub de 0.298, estos dos juntos indican la calidad que tiene el modelo de la proteína para ser usado en la interacción. El valor obtenido para el puntaje del docking fue de -216.91. Estos valores indican que la predicción fue buena y puede usarse para el estudio de la interacción, las funciones de

puntuación nos ayudan a predecir de forma aproximada la afinidad de unión entre dos moléculas una vez acopladas, el proceso para clasificar que ligandos tienen mayor probabilidad de que interactúen favorablemente con un receptor en particular se mide en función de la energía libre de la unión predicha, por lo tanto, en el caso del puntaje de docking, entre menor sea el número es más probable que se cumpla la predicción. Los aminoácidos de la proteína que se encuentran involucrados en la interacción son arginina 28, valina 32, glutamato 33, lisina 36, glutamato 47, arginina 50, arginina 51, glutamato 53 y arginina 54.

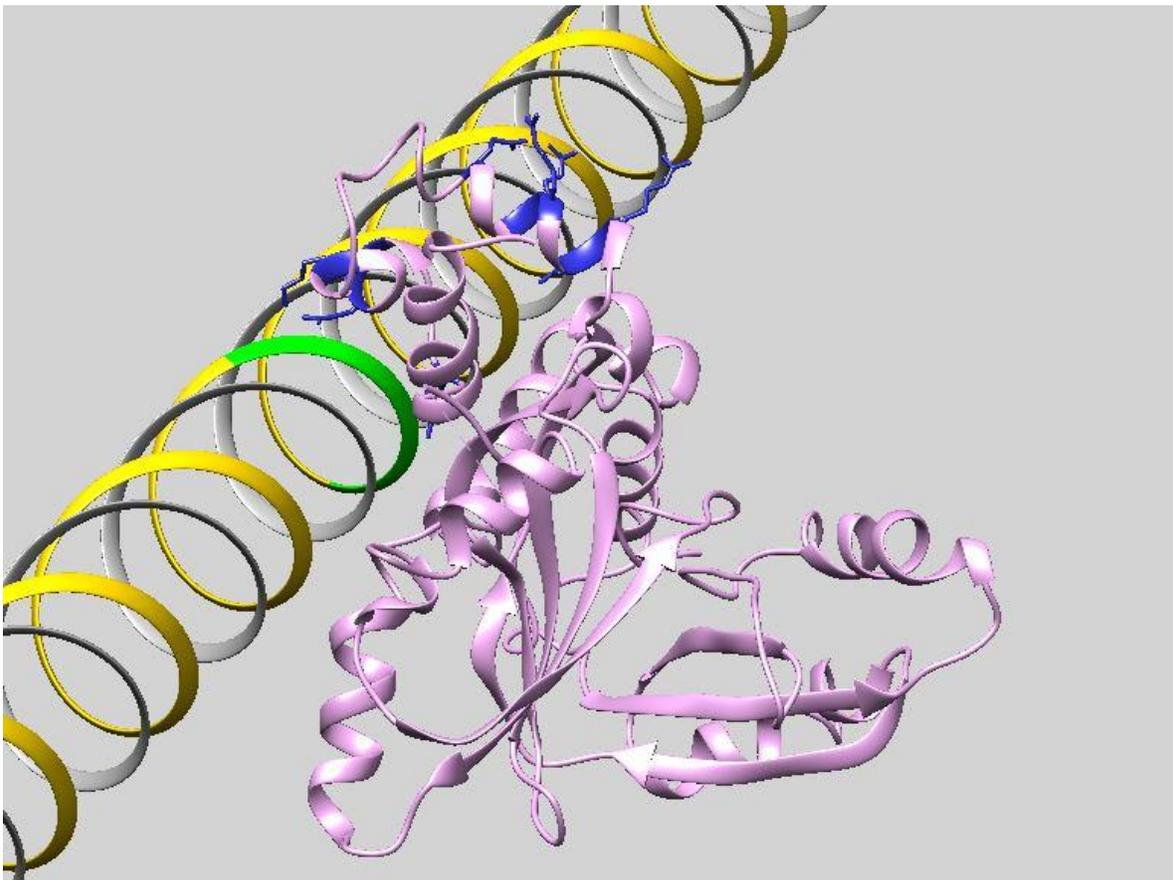


Figura 23. Acoplamiento molecular entre el ADN *aroX-npsA* con el dímero de Lrp de *K. oxytoca*. En color amarillo se observa la cadena 5' a 3' mientras que en gris tenemos la cadena 3' a 5', de color verde se marca el sitio putativo de unión de Lrp. En color rosa se tiene el dímero de Lrp, y en azul los aminoácidos involucrados en la interacción con el ADN.

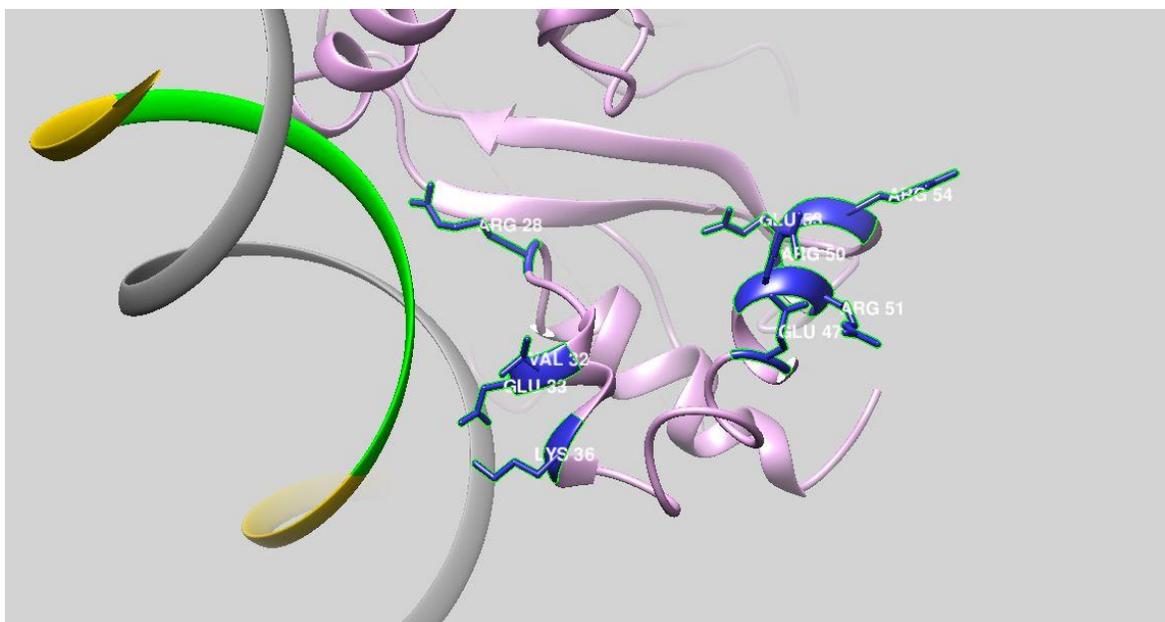


Figura 24. Acercamiento al acoplamiento molecular entre el ADN *aroX-npsA* con el dímero de Lrp de *K. oxytoca*. En color amarillo se observa la cadena 5' a 3' mientras que en gris tenemos la cadena 3' a 5', de color verde se marca el sitio putativo de unión de Lrp. En color rosa se tiene el dímero de Lrp, y en azul los aminoácidos involucrados en la interacción con el ADN.

El segundo modelo que se muestra en las figuras 25 y 26 es la predicción de unión para la regulación de la transcripción del gen *aroX* ya que la interacción se da en la cadena 3' a 5'. El puntaje de LG fue de 3.868 y de MaxSub 0.317. El puntaje del docking fue de -209.64 indicando que los modelos son buenos para realizar el análisis. Los aminoácidos de la proteína que se encuentran involucrados en la interacción son aspartato 26, arginina 28, isoleucina 29, serina 30, valina 32, glutamato 33, leucina 34, lisina 36, arginina 37, leucina 46, glutamato 47 y arginina 50

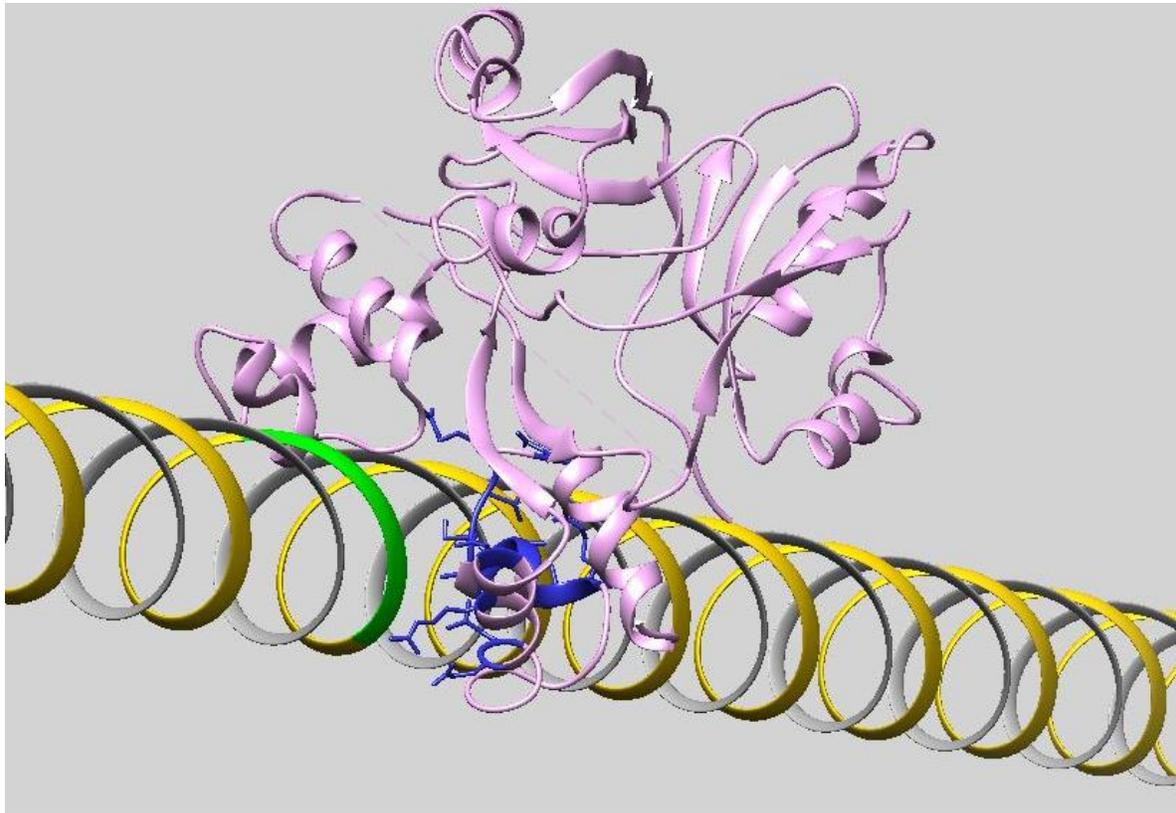


Figura 25. Acoplamiento molecular entre el ADN *aroX-npsA* con el dímero de Lrp de *K. oxytoca*. En color amarillo se observa la cadena 3' a 5' mientras que en gris tenemos la cadena 5' a 3', de color verde se marca el sitio putativo de unión de Lrp. En color rosa se tiene el dímero de Lrp, y en azul los aminoácidos involucrados en la interacción con el ADN.

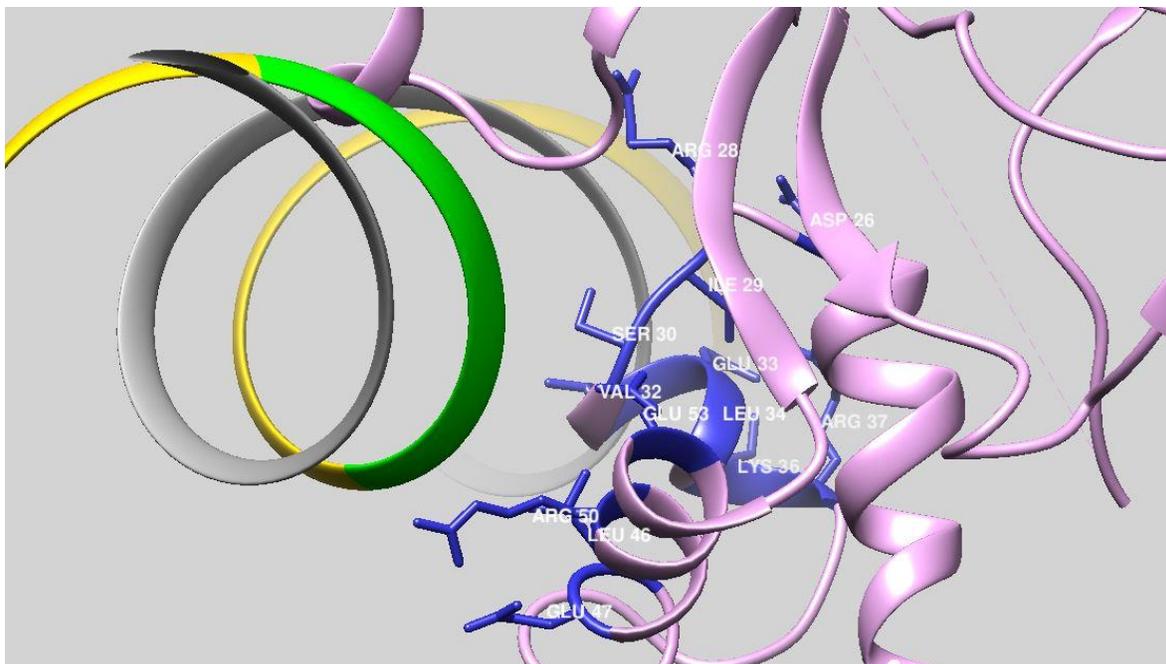


Figura 26. Acercamiento al acoplamiento molecular entre el DNA *aroX-npsA* con el dímero de Lrp de *K. oxytoca*. En color amarillo se observa la cadena 3' a 5' mientras que en gris tenemos la cadena 5' a 3', de color verde se marca el sitio putativo de unión de Lrp. En color rosa se tiene el dímero de Lrp, y en azul los aminoácidos involucrados en la interacción con el ADN.

10.6 Identificación *in silico* de promotores para *aroX* y *npsA*

Se identificó un promotor en la cadena codificante del gen *aroX* con un puntaje de probabilidad de 0.96 (Figura 27) y uno en la cadena codificante del gen *npsA* con un puntaje de probabilidad de 0.91 (Figura 28). El sitio de inicio de la transcripción para el gen *aroX* es un nucleótido cuya base nitrogenada es timina (T) y se encuentra localizado 151 nucleótidos río arriba del triplete ATG, el cual codifica para el codón de inicio. El sitio de inicio de la transcripción para el gen *npsA* es un nucleótido cuya base nitrogenada es adenina (A) y se encuentra localizado 163 nucleótidos río arriba del triplete ATG.

Con base en lo anterior, el análisis *in silico* sugiere que la expresión de ambos genes pudiera estar sujeta a regulación por “riboswitch” ya que poseen una secuencia líder muy larga en el contexto procariótico (Hollands *et al.*, 2012). La regulación mediada por “riboswitch” ocurre principalmente en genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo (Bastet *et al.*, 2018) y esto es consistente con los genes *aroX* y *npsA*, los cuales están involucrados en la síntesis del metabolito tóxico TV. De hecho, *aroX* codifica para una enzima que en conjunto con otras enzimas participan en la vía del Shikimato para la síntesis de los aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano) (Stogios *et al.*, 2022).

En los promotores identificados *in silico*, se ubicaron las cajas -10 y -35. Para el promotor del gen *aroX* (Figura 24), la caja -10 fue TATAAA, coincidiendo cinco de seis nucleótidos de la secuencia consenso reportada (TATAAT) y la caja -35 fue ATAACA, coincidiendo cuatro de seis nucleótidos de la secuencia consenso reportada (TTGACA). Para el promotor del gen *npsA* (Figura 25), la caja -10 fue TAGACT, coincidiendo cuatro de seis nucleótidos de la secuencia consenso reportada (TATAAT) y la caja -35 fue TTGACT, coincidiendo cinco de seis nucleótidos de la secuencia consenso reportada (TTGACA).

Finalmente, se localizaron y se marcaron en color azul celeste los sitios putativos para la unión de Lrp identificados mediante docking molecular, los cuales se encontraron localizados -107 y -92 nucleótidos río arriba con respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1), para *aroX* y *npsA*, respectivamente (Figuras 24 y 25). Éstos resultados sugieren que la regulación de ambos genes por la proteína Lrp podría ser de tipo clase I; es decir, que al unirse Lrp en esas posiciones interactuaría con el extremo carboxilo terminal de las dos subunidades alfa de la ARN polimerasa, favoreciendo así su interacción sobre las cajas -10 y -35 en el promotor para activar la transcripción (Browning and Busby 2004; Browning and Busby, 2016).

```

5'          CACTCTCTCCTGGAGAATTAGGAACGTTCACACGCATAAAATCTTCTCTT
          GAAGAAGAAATTAAAGATCTAAAGAAATGCCGCCAGCTTACCGTGAGATGCTTCTAAGAAAACACCGCAA
          AACAAGCAACATATAAGCAACACAAACATAACTAAGCGTTGCTTTC AATAGTCTATCTTCGAACCTCACC
          Sitio putativo para Lrp
          CTCAGTCAATTTGATTTCCAAAAAAAATCATATAGCAAAAAATAAAAAACAATCAAAAAATAATAACCAT
          -35          -10          +1
          AAAAAATCAATAACATGTAAAAACATAAAATCAAAATATAAAATTTTTTTGATTGACATAATGCACTCATTGGC
          Puntaje del promotor: 0.96
          GTGCAATATTTGTGCAAACCGTATCGTCTTTCATGTCCAGTAAACAGACAAGGAATAGCACTTTCTCATC
          GCTTTTTTGTAAAAAACAAACGAAAAACCTGTTAAATTTGAGTGAGAGATTAGAAATG          3'
          aroX →
  
```

Figura 27. Identificación *in silico* del promotor para el gen *aroX*. Se muestra subrayado el posible promotor identificado, así como el puntaje de probabilidad obtenido. Se indican en negritas: el triplete que codifica para el codón de inicio, el sitio de inicio de la transcripción (+1) y las cajas -10 y -35. En color azul celeste se indica el sitio putativo de unión para la proteína Lrp, el cual se obtuvo mediante docking molecular.

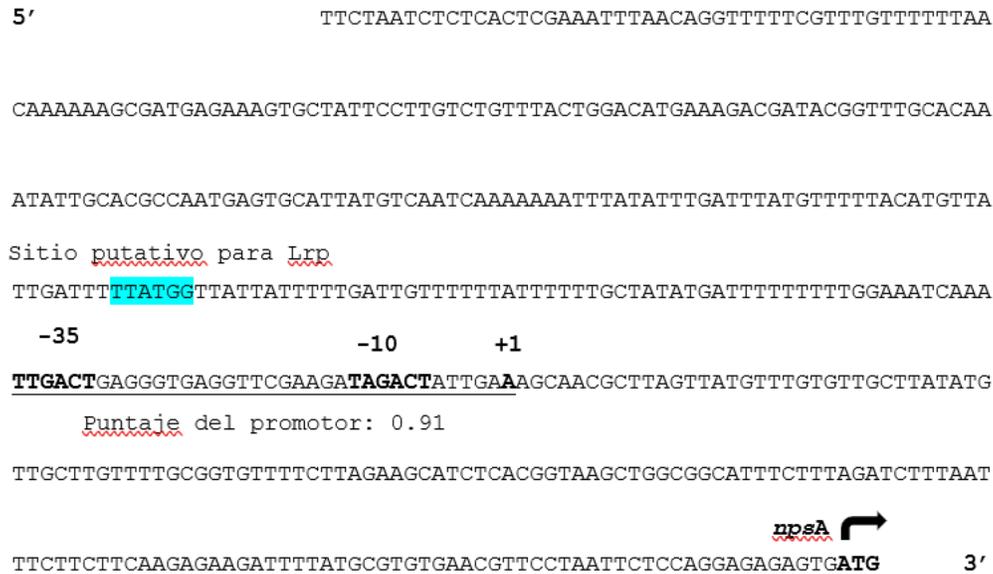


Figura 28. Identificación *in silico* del promotor para el gen *npsA*. Se muestra subrayado el posible promotor identificado, así como el puntaje de probabilidad obtenido. Se indican en negritas: el triplete que codifica para el codón de inicio, el sitio de inicio de la transcripción (+1) y las cajas -10 y -35. En color azul celeste se indica el sitio putativo de unión para la proteína Lrp obtenido mediante docking molecular.

En conjunto, todos los resultados obtenidos en este trabajo constituyen el primer estudio de la actividad reguladora de la proteína Lrp en *K. oxytoca* y sugieren un blanco para el desarrollo de moléculas que inhiban la actividad reguladora de Lrp y consecuentemente la virulencia de *K. oxytoca*.

XI. Conclusiones

- La proteína Lrp activa la expresión de los genes *aroX* y *npsA* los cuales son indispensables para la biosíntesis de la citotoxina TV de *K. oxytoca*.
- La actividad reguladora de Lrp sobre los genes *aroX* y *npsA* es dependiente de leucina.
- Los ensayos de interacción DNA-proteína demostraron que la actividad reguladora de Lrp es de manera directa mediante la interacción con la región reguladora intergénica de los genes *aroX* y *npsA*.
- Mediante análisis *in silico* se determinó que existe un posible promotor para cada uno de los genes en estudio (*aroX* y *npsA*) y dos sitios putativos de unión de Lrp localizados río arriba de las cajas -35, sugiriendo un probable mecanismo de activación clásico para ambos genes.



XII. Recomendaciones

Con el objetivo de dar continuidad a este proyecto, es necesario tomar en cuenta las siguientes recomendaciones para mayor obtención de avances:

- Realizar la complementación de la cepa Δlrp con el objetivo de determinar si se restablecen los niveles de expresión con respecto a la cepa silvestre.
- Evaluar el efecto citotóxico de la cepa Δlrp sobre células epiteliales y compararlo con el efecto citotóxico de la cepa silvestre.
- Realizar mutaciones puntuales de los posibles sitios de unión de Lrp y confirmar *in vitro* su relevancia para la unión de dicha proteína sobre estas regiones del ADN.
- Cuantificar la TV en los sobrenadantes de las cepas en estudio por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) o por resonancia magnética nuclear (NMR).
- Evaluar el efecto citotóxico de las cepas utilizando un modelo murino.



XIII. Referencias

- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., and Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 33, 366–369. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
- Baek CH, Wang S, Roland KL, Curtiss R. (2009). 3rd Leucine-responsive regulatory protein (Lrp) acts as a virulence repressor in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*; 191:1278-1292.
- Beaugerie, L., Metz, M., Barbut, F., Bellaiche, G., Bouhnik, Y., Raskine, L. (2003). *Klebsiella oxytoca* as an agent of antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 1, 370–376. [https://doi.org/10.1053/S1542-3565\(03\)00183-6](https://doi.org/10.1053/S1542-3565(03)00183-6)
- Bennett, J. E., Dolin, R., Md, D. R., & Md, M. B. J. (2019). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases: 2-Volume Set (9th ed.)*. Elsevier. <https://www.amazon.com.mx/Bennetts-Principles-Practice-Infectious-Diseases/dp/1455748013>
- Boye, K., & Hansen, D. S. (2003). Sequencing of 16S rDNA of *Klebsiella*: taxonomic relations within the genus and to other Enterobacteriaceae. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 292(7-8), 495–503. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00228>
- Briat, J. F., Lobréaux, S., Grignon, N., & Vansuyt, G. (1999). Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 56(1-2), 155–166. <https://doi.org/10.1007/s000180050014>
- Brinkman, A. B., Ettema, T. J., de Vos, W. M., & van der Oost, J. (2003). The Lrp family of transcriptional regulators. *Molecular microbiology*, 48(2), 287–294. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03442.x>
- Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., & Grimont, P. (2009). Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PloS one*, 4(3), e4982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004982>



- Browning, D. F., & Busby, S. J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature reviews. Microbiology*, 2(1), 57–65. <https://doi.org/10.1038/nrmicro787>
- Browning, D. F., & Busby, S. J. (2016). Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 14(10), 638–650. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.103>
- Chakraborty S, Mohsina K, Sarker PK, et al (2016) Prevalence, antibiotic susceptibility profiles and ESBL production in *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* among hospitalized patients. *Period Biol* 118:53-58. <https://doi.org/https://doi.org/10.18054/pb.2016.118.1.3160>
- Chen, S., & Calvo, J. M. (2002). Leucine-induced Dissociation of *Escherichia coli* Lrp Hexadecamers to Octamers. *Journal of Molecular Biology*, 318(4), 1031-1042. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)00187-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)00187-0)
- Chen, S., Rosner, M. H., & Calvo, J. M. (2001). Leucine-regulated self-association of leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*. Edited by M. F. Moody. *Journal of Molecular Biology*, 312(4), 625-635. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4955>
- Chen, K. Y., Rathod, J., Chiu, Y. C., Chen, J. W., Tsai, P. J., & Huang, I. H. (2019). The Transcriptional Regulator Lrp Contributes to Toxin Expression, Sporulation, and Swimming Motility in *Clostridium difficile*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 356. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00356>
- Cheng, V. C., Yam, W. C., Tsang, L. L., Yau, M. C., Siu, G. K., Wong, S. C., Chan, J. F., To, K. K., Tse, H., Hung, I. F., Tai, J. W., Ho, P. L., & Yuen, K. Y. (2012). Epidemiology of *Klebsiella oxytoca*-associated diarrhea detected by Simmons citrate agar supplemented with inositol, tryptophan, and bile salts. *Journal of clinical microbiology*, 50(5), 1571–1579. <https://doi.org/10.1128/JCM.00163-12>
- Cho, B.-K., Barrett, C. L., Knight, E. M., Park, Y. S., & Palsson, B. O. (2008). Genome-scale reconstruction of the Lrp regulatory network in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(49), 19462-19467. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807227105>



- Cipolla, L., Araújo, A. C., Airoidi, C., & Bini, D. (2009). Pyrrolo[2,1-c] [1,4]benzodiazepine as a scaffold for the design and synthesis of anti-tumour drugs. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 9(1), 1–31. <https://doi.org/10.2174/187152009787047743>
- Cordone, A., Lucchini, S., De Felice, M., & Ricca, E. (2011). Direct and indirect control of Lrp on LEE pathogenicity genes of *Citrobacter rodentium*. *FEMS microbiology letters*, 325(1), 64–70. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02411.x>
- Cowles, K. N., Cowles, C. E., Richards, G. R., Martens, E. C., & Goodrich-Blair, H. (2007). The global regulator Lrp contributes to mutualism, pathogenesis and phenotypic variation in the bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *Cellular microbiology*, 9(5), 1311–1323. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00873.x>
- Darby, A., Lertpiriyapong, K., Sarkar, U., Seneviratne, U., Park, D. S., Gamazon, E. R., Batchelder, C., Cheung, C., Buckley, E. M., Taylor, N. S., Shen, Z., Tannenbaum, S. R., Wishnok, J. S., & Fox, J. G. (2014). Cytotoxic and Pathogenic Properties of *Klebsiella oxytoca* Isolated from Laboratory Animals. *PLoS ONE*, 9(7), e100542. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100542>
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640-6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
- de los Rios, S., & Perona, J. J. (2007). Structure of the *Escherichia coli* Leucine-responsive Regulatory Protein Lrp Reveals a Novel Octameric Assembly. *Journal of Molecular Biology*, 366(5), 1589-1602. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.032>
- Decré, D., Burghoffer, B., Gautier, V., Petit, J. C., & Arlet, G. (2004). Outbreak of multi-resistant *Klebsiella oxytoca* involving strains with extended-spectrum beta-lactamases and strains with extended-spectrum activity of the chromosomal beta-lactamase. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 54(5), 881–888. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh440>
- Dellagi, A., Rigault, M., Segond, D., Roux, C., Kraepiel, Y., Cellier, F., Briat, J. F., Gaymard, F., & Expert, D. (2005). Siderophore-mediated upregulation of *Arabidopsis* ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. *The Plant journal: for cell*



and molecular biology, 43(2), 262–272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02451.x>

- Dornisch, E., Pletz, J., Glabonjat, R. A., Martin, F., Lembacher-Fadum, C., Neger, M., Högenauer, C., Francesconi, K., Kroutil, W., Zangger, K., Breinbauer, R., & Zechner, E. L. (2017). Biosynthesis of the Enterotoxic Pyrrolobenzodiazepine Natural Product Tilivalline. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 56(46), 14753–14757. <https://doi.org/10.1002/anie.201707737>
- Freddolino, P. L., Amemiya, H. M., Goss, T. J., & Tavazoie, S. (2021). Dynamic landscape of protein occupancy across the *Escherichia coli* chromosome. *PLoS biology*, 19(6), e3001306. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001306>
- Graveline, R., Mourez, M., Hancock, M. A., Martin, C., Boisclair, S., & Harel, J. (2011). Lrp-DNA complex stability determines the level of ON cells in type P fimbriae phase variation. *Molecular microbiology*, 81(5), 1286–1299. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07761.x>
- Gutiérrez, Biol, Andrés Julián, & Gómez, Arley, & Arenas, Nelson Enrique, & Polanco, Juan Carlos, & Salazar, Luz Mary (2009). Construcción de una filogenia molecular para las especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* basada en los genes ARNr 16S y ARN polimerasa subunidad. *Revista Ciencias de la Salud*, 7(2), 22-29. ISSN: 1692-7273. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=56216304004>
- Hajishengallis, G., and Lamont, R. J. (2016). Dancing with the stars: how choreographed bacterial interactions dictate Nososymbiocity and give rise to keystone pathogens, accessory pathogens, and Pathobionts. *Trends Microbiol.* 24, 477–489. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.010>
- Haney, S. A., Platko, J. V., Oxender, D. L., & Calvo, J. M. (1992). Lrp, a leucine-responsive protein, regulates branched-chain amino acid transport genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174(1), 108-115. <https://doi.org/10.1128/jb.174.1.108-115.1992>
- Hering, N. A., Fromm, A., Bücker, R., Gorkiewicz, G., Zechner, E., Högenauer, C., Fromm, M., Schulzke, J. D., & Troeger, H. (2019). Tilivalline- and Tilimycin-Independent



Effects of *Klebsiella oxytoca* on Tight Junction-Mediated Intestinal Barrier Impairment. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5595. <https://doi.org/10.3390/ijms20225595>

Herridge, W. P., Shibu, P., O'Shea, J., Brook, T. C., & Hoyles, L. (2020). Bacteriophages of *Klebsiella spp.*, their diversity and potential therapeutic uses. *Journal of medical microbiology*, 2(69), 175-194. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001141>

Herzog, K. A. T., Schneditz, G., Leitner, E., Feierl, G., Hoffmann, K. M., Zollner-Schwetz, I., Krause, R., Gorkiewicz, G., Zechner, E. L., & Hogenauer, C. (2014). Genotypes of *Klebsiella oxytoca* Isolates from Patients with Nosocomial Pneumonia Are Distinct from Those of Isolates from Patients with Antibiotic-Associated Hemorrhagic Colitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1607-1616. <https://doi.org/10.1128/jcm.03373-13>

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51–59. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90358-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90358-2)

Högenauer, C., Langner, C., Beubler, E., Lippe, I. T., Schicho, R., Gorkiewicz, G. (2006). *Klebsiella oxytoca* as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *N. Engl. J. Med.* 355, 2418–2426. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa054765>

Hollands, K., Proshkin, S., Sklyarova, S., Epshtein, V., Mironov, A., Nudler, E., & Groisman, E. A. (2012). Riboswitch control of Rho-dependent transcription termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14), 5376–5381. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112211109>

Holm, L., Laakso, L.M. 2016. Dali server update. *Nucleic acids research*, 44(W1), W351-W355.

Hussa, E. A., Casanova-Torres, Á. M., & Goodrich-Blair, H. (2015). The Global Transcription Factor Lrp Controls Virulence Modulation in *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of bacteriology*, 197(18), 3015–3025. <https://doi.org/10.1128/JB.00272-15>



- Ihara, K., Sato, K., Hori, H., Makino, Y., Shigenobu, S., Ando, T., Isogai, E., & Yoneyama, H. (2017). Expression of the *alaE* gene is positively regulated by the global regulator Lrp in response to intracellular accumulation of l-alanine in *Escherichia coli*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 123(4), 444–450. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.11.015>
- Kelley, L.A., Sternberg, M.J. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature protocols*, 4(3), 363-371.
- Koneman E, Allen S, Dowell VR, Sommers H. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires, Argentina; pp 145-150.
- Kovtunovych, G., Lytvynenko, T., Negrutskya, V., Lar, O., Brisse, S., & Kozyrovska, N. (2003). Identification of *Klebsiella oxytoca* using a specific PCR assay targeting the polygalacturonase *pehX* gene. *Research in microbiology*, 154(8), 587–592. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00148-7](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00148-7)
- Kroner, G. M., Wolfe, M. B., & Freddolino, P. L. (2018). *Escherichia coli* Lrp Regulates One-Third of the Genome via Direct, Cooperative, and Indirect Routes. *Journal of Bacteriology*, 201(3), e00411-18. <https://doi.org/10.1128/jb.00411-18>
- Lin, W., Kovacicova, G., & Skorupski, K. (2007). The quorum sensing regulator HapR downregulates the expression of the virulence gene transcription factor AphA in *Vibrio cholerae* by antagonizing Lrp- and VpsR-mediated activation. *Molecular microbiology*, 64(4), 953–967. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05693.x>
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1128/mBio.02470-20>
- Lowe, C., Willey, B., O'Shaughnessy, A., Lee, W., Lum, M., Pike, K., Larocque, C., Dedier, H., Dales, L., Moore, C., McGeer, A., & Mount Sinai Hospital Infection Control Team (2012). Outbreak of extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella oxytoca* infections associated with contaminated handwashing sinks(1). *Emerging infectious diseases*, 18(8), 1242–1247. <https://doi.org/10.3201/eid1808.111268>
- Marcus D Hanwell, Donald E Curtis, David C Lonie, Tim Vandermeersch, Eva Zurek and Geoffrey R Hutchison (2012). “Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform” *Journal of Cheminformatics*, 4:17.



- McFarland, K. A., Lucchini, S., Hinton, J. C., & Dorman, C. J. (2008). The leucine-responsive regulatory protein, Lrp, activates transcription of the *fim* operon in *Salmonella enterica* serovar typhimurium via the *fimZ* regulatory gene. *Journal of bacteriology*, 190(2), 602–612. <https://doi.org/10.1128/JB.01388-07>
- Medina-Aparicio, L., Rebollar-Flores, J. E., Gallego-Hernández, A. L., Vázquez, A., Olvera, L., Gutiérrez-Ríos, R. M., Calva, E., & Hernández-Lucas, I. (2011). The CRISPR/Cas immune system is an operon regulated by LeuO, H-NS, and leucine-responsive regulatory protein in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Journal of bacteriology*, 193(10), 2396–2407. <https://doi.org/10.1128/JB.01480-10>
- Milatovic, D., Schmitz, F. J., Brisse, S., Verhoef, J., & Fluit, A. C. (2000). *In vitro* activities of sitafloxacin (DU-6859a) and six other fluoroquinolones against 8,796 clinical bacterial isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(4), 1102–1107. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.4.1102-1107.2000>
- Minami, J., Okabe, A., Shiode, J., & Hayashi, H. (1989). Production of a unique cytotoxin by *Klebsiella oxytoca*. *Microbial Pathogenesis*, 7(3), 203-211. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(89\)90056-9](https://doi.org/10.1016/0882-4010(89)90056-9)
- Mizuta, K., Ohta, M., Mori, M., Hasegawa, T., Nakashima, I., & Kato, N. (1983). Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types. *Infection and immunity*, 40(1), 56–61. <https://doi.org/10.1128/iai.40.1.56-61.1983>
- Modrzejewska, M., Kawalek, A., & Bartosik, A. A. (2021). The Lrp/AsnC-Type Regulator PA2577 Controls the EamA-like Transporter Gene PA2576 in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13340. <https://doi.org/10.3390/ijms222413340>
- Newman, E. B., D'Ari, R., & Lin, R. T. (1992). The leucine-Lrp regulon in *E. coli*: a global response in search of a raison d'être. *Cell*, 68(4), 617–619. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90135-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90135-y)
- Peeters, E., & Charlier, D. (2010). The Lrp family of transcription regulators in *archaea*. *Archaea* (Vancouver, B.C.), 2010, 750457. <https://doi.org/10.1155/2010/750457>



- Perez, J. C., & Groisman, E. A. (2007). Acid pH activation of the *PmrA/PmrB* two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Molecular microbiology*, 63(1), 283–293. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05512.x>
- Pérez-Vazquez, M., Oteo-Iglesias, J., Sola-Campoy, P. J., Carrizo-Manzoni, H., Bautista, V., Lara, N., Aracil, B., Alhambra, A., Martínez-Martínez, L., Campos, J., Sánchez-Romero, I., Orden, B., Martínez-Ruiz, R., Aznar, E., Cercenado, E., de la Iglesia, P., López-Urrutia, L., Salso, S., Vicente Saz, J., ... Saez, A. (2019). Characterization of Carbapenemase-Producing *Klebsiella oxytoca* in Spain, 2016–2017. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(6), e02529-18. <https://doi.org/10.1128/aac.02529-18>
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*, 11(4), 589–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589>
- Rebollar-Flores, J. E., Medina-Aparicio, L., Osio-Becerro, V. E., Villarreal, J. M., Mayo, S., Mendoza, B. D., Rodríguez-Gutierrez, S., Olvera, L., Dávila, S., Encarnación, S., Martínez-Batallar, A. G., Calva, E., & Hernández-Lucas, I. (2020). The *Salmonella enterica* Serovar Typhi ItrR Gene Encodes Two Proteins Whose Transcriptional Expression Is Upregulated by Alkaline pH and Repressed at Their Promoters and Coding Regions by H-NS and Lrp. *Journal of bacteriology*, 202(13), e00783-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00783-19>
- Rodríguez-Valverde, D., León-Montes, N., Soria-Bustos, J., Martínez-Cruz, J., González-Ugalde, R., Rivera-Gutiérrez, S., González-Y-Merchand, J. A., Rosales-Reyes, R., García-Morales, L., Hirakawa, H., Fox, J. G., Girón, J. A., De la Cruz, M. A., & Ares, M. A. (2021). cAMP Receptor Protein Positively Regulates the Expression of Genes Involved in the Biosynthesis of *Klebsiella oxytoca* Tilivalline Cytotoxin. *Frontiers in microbiology*, 12, 743594. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.743594>
- Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Synthetic oligonucleotides. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571698599799806720>



- Savino, F., Cordisco, L., Tarasco, V., Calabrese, R., Palumeri, E., & Matteuzzi, D. (2009). Molecular identification of coliform bacteria from colicky breastfed infants. *Acta paediatrica* (Oslo, Norway: 1992), 98(10), 1582–1588. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2009.01419.x>
- Schneditz, G., Rentner, J., Roier, S., Pletz, J., Herzog, K. A. T., Bucker, R., Troeger, H., Schild, S., Weber, H., Breinbauer, R., Gorkiewicz, G., Hogenauer, C., & Zechner, E. L. (2014). Enterotoxicity of a nonribosomal peptide causes antibiotic-associated colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(36), 13181-13186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403274111>
- Schulz-Stübner, S., & Kniehl, E. (2011). Transmission of extended-spectrum β -lactamase *Klebsiella oxytoca* via the breathing circuit of a transport ventilator: root cause analysis and infection control recommendations. *Infection control and hospital epidemiology*, 32(8), 828–829. <https://doi.org/10.1086/661225>
- Shimada, T., Saito, N., Maeda, M., Tanaka, K., & Ishihama, A. (2015). Expanded roles of leucine-responsive regulatory protein in transcription regulation of the *Escherichia coli* genome: Genomic SELEX screening of the regulation targets. *Microbial genomics*, 1(1), e000001. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000001>
- Singh, L., Cariappa, M. P., & Kaur, M. (2016). *Klebsiella oxytoca*: An emerging pathogen?. *Medical journal, Armed Forces India*, 72(Suppl 1), S59–S61. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2016.05.002>
- Smith, S. A., Campbell, S. J., Webster, D., Curley, M., Leddin, D., & Forward, K. R. (2009). A study of the prevalence of cytotoxic and non-cytotoxic *Klebsiella oxytoca* fecal colonization in two patient populations. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, 20(4), e169–e172. <https://doi.org/10.1155/2009/913895>
- Stampfer, L., Deutschmann, A., Dür, E., Eitelberger, F. G., Fürpass, T., Gorkiewicz, G., Heinz-Erian, P., Heller, I., Herzog, K., Hopfer, B., Kerbl, R., Klug, E., Krause, R., Leitner, E., Mache, C., Müller, T., Pansy, J., Pocivalnik, M., Scheuba, E., Schneditz, G., ... Hoffmann, K. M. (2017). Causes of hematochezia and hemorrhagic antibiotic-



- associated colitis in children and adolescents. *Medicine*, 96(33), e7793.
<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000007793>
- Stogios, P. J., Liston, S. D., Semper, C., Quade, B., Michalska, K., Evdokimova, E., Ram, S., Otwinowski, Z., Borek, D., Cowen, L. E., & Savchenko, A. (2022). Molecular analysis and essentiality of Aro1 shikimate biosynthesis multi-enzyme in *Candida albicans*. *Life science alliance*, 5(8), e202101358.
<https://doi.org/10.26508/lsa.202101358>
- Tse, H., Gu, Q., Sze, K. H., Chu, I. K., Kao, R. Y., Lee, K. C., Lam, C. W., Yang, D., Tai, S. S., Ke, Y., Chan, E., Chan, W. M., Dai, J., Leung, S. P., Leung, S. Y., & Yuen, K. Y. (2017). A tricyclic pyrrolobenzodiazepine produced by *Klebsiella oxytoca* is associated with cytotoxicity in antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *The Journal of biological chemistry*, 292(47), 19503–19520.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.791558>
- Unterhauser, K., Pörtl, L., Schneditz, G., Kienesberger, S., Glabonjat, R. A., Kitsera, M., Pletz, J., Josa-Prado, F., Dornisch, E., Lembacher-Fadum, C., Roier, S., Gorkiewicz, G., Lucena, D., Barasoain, I., Kroutil, W., Wiedner, M., Loizou, J. I., Breinbauer, R., Díaz, J. F., ... Zechner, E. L. (2019). *Klebsiella oxytoca* enterotoxins tilimycin and tilivalline have distinct host DNA-damaging and microtubule-stabilizing activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(9), 3774-3783.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1819154116>
- Wang, M., Cao, B., Yu, Q., Liu, L., Gao, Q., Wang, L., & Feng, L. (2008). Analysis of the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer region in *Klebsiella* species. *Journal of clinical microbiology*, 46(11), 3555–3563. <https://doi.org/10.1128/JCM.00927-08>
- Willins, D. A., Ryan, C. W., Platko, J. V., & Calvo, J. M. (1991). Characterization of Lrp, and *Escherichia coli* regulatory protein that mediates a global response to leucine. *The Journal of biological chemistry*, 17(266), 10768-10778.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2040596/>
- Xu, Y., Tang, Y., Wang, N., Liu, J., Cai, X., Cai, H., Li, J., Tan, G., Liu, R., Bai, L., Zhang, L., Wu, H., & Zhang, B. (2020). Transcriptional regulation of a leucine-responsive regulatory protein for directly controlling lincomycin biosynthesis in *Streptomyces*



lincolnsis. Applied microbiology and biotechnology, 104(6), 2575–2587.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10381-w>

Yan Y, Tao H, He J, Huang S-Y. (2020) The HDOCK server for integrated protein-protein docking. Nature Protocols, <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0312-x>

Yang, J., Long, H., Hu, Y., Feng, Y., McNally, A., & Zong, Z. (2022). *Klebsiella oxytoca* Complex: Update on Taxonomy, Antimicrobial Resistance, and Virulence. Clinical microbiology reviews, 35(1), e0000621. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-21>

Zhao, X., Zhang, Y., & Huang, X. (2018). Pathogenicity-island-encoded regulatory RNAs regulate bacterial virulence and pathogenesis. Microbial pathogenesis, 125, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.028>

Zollner-Schwet, I., Herzog, K. A. T., Feierl, G., Leitner, E., Schneditz, G., Sprenger, H., et al. (2015). The toxin-producing Pathobiont *Klebsiella oxytoca* is not associated with flares of inflammatory bowel diseases. Dig. Dis. Sci. 60, 3393–3398. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3765-y>