



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**ANÁLISIS GENÉTICO DEL ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL PerA
DURANTE LA ACTIVACIÓN DE LOS OPERONES *bfp* Y *per* EN
Escherichia coli ENTEROPATÓGENA**

TESIS

Que para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias (Microbiología)

PRESENTA:

MC. CLAUDIA M^a. GARCÍA ZACARÍAS

ASESORES DE TESIS:

DC. YGNACIO MARTÍNEZ LAGUNA

DC. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA

Quiero compartir con ustedes el secreto que me ha llevado a alcanzar mis metas:

mi fuerza reside únicamente en mi tenacidad.

Louis Pasteur



BUAP

Puebla, Pue, a 26 de marzo de 2015.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**


Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Doctorado de la
M.C. Claudia María García Zacarias, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**"Análisis genético del activador transcripcional PerA durante la activación de los operones
bfp y per en Escherichia coli Enteropatogena"**


A nuestro juicio, la M.C. García Zacarias, puede proceder a la impresión de la tesis y a la
presentación del examen de grado correspondiente.


Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.


Atentamente.
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"


D.C. Miguel Castañeda Lucio


D.C. Ricardo Carreño López


D.C. Candelario Vázquez Cruz


D.C. Luis Javier Martínez Morales


D.C. José Antonio Ibarra García

Instituto
de Ciencias

Cd. 102 E, Ciudad Universitaria,
Col. San Manuel, Puebla, Pue.
C.P. 72570
01 (222) 828 55 00 Ext. 7090 y 7051



BUAP

Puebla, Pue. a 26 de marzo de 2015.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Doctorado de la **M.C. Claudia María García Zacarías**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Análisis genético del activador transcripcional PerA durante la activación de los operones *bfp* y *per* en *Escherichia coli* Enteropatógena”

A nuestro juicio, la M.C. García Zacarías puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

D.C. Miguel Castañeda Lucio

D.C. Candelario Vázquez Cruz

D.C. Ricardo Carreño López

D.C. Luis Javier Martínez Morales

D.C. José Antonio Ibarra García

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios por no dárme todo, sino solo lo que necesito.

A mis padres:

El hacer el padre por su hijo es hacer por sí mismo.

Miguel de Cervantes Saavedra

Papá q.e.p.d., que ya no estás conmigo, Mamá:

Quiero darles las gracias por haber sido siempre los mejores padres para mí. Me han enseñado a nunca dejar de pelear por lo que uno quiere. Espero que Dios siempre esté con ustedes. Los amo mucho.

A mi hermana:

Pensar en ti es sentir que el cariño y el abrazo cálido me envuelven. Una hermana como tú es quien me hace sentir que puedo contar con alguien incondicional y que en momentos de tristeza o de alegría, estás conmigo. Gracias hermana mía.

A mi hermano:

Aunque a veces me saques de mis casillas y tengamos nuestros malentendidos, nunca podría darte la espalda, porque me importas más de lo que me gusta admitir. Solo deseo que estés consciente de que siempre puedes contar conmigo.

A mis tutores y miembros del comité tutorial:

Que me han acompañado durante el largo camino, brindándome siempre su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de conocimientos y afianzando mi formación como estudiante de doctorado.

Basta un poco de espíritu aventurero para estar siempre satisfechos, pues en esta vida, gracias a Dios, nada sucede como deseábamos, como suponíamos, ni como teníamos previsto. Noel Clarasó

ANÁLISIS GENÉTICO DEL ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL
PerA DURANTE LA ACTIVACIÓN DE LOS OPERONES *bfp* Y *per*
EN *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA

RESUMEN

Esta investigación comprende la caracterización, en *Escherichia coli* Enteropatógena, de mutantes en el activador transcripcional PerA, que posiblemente participen en interacción con la RNA polimerasa; así como, mutantes de las subunidades alfa y sigma de la RNA polimerasa, que intervengan en la interacción mencionada, durante la activación de los operones *bfp* y *per*.

Se realizaron ensayos de actividad transcripcional, mediante el sistema indicador de la cloranfenicol acetil transferasa, para medir el nivel de expresión de los promotores *bfpA* y *perA*. Inicialmente en presencia de mutantes en PerA, se seleccionaron aquellas mutantes que redujeron considerablemente la expresión de uno o ambos promotores.

Las mutantes seleccionadas se fusionaron a la proteína de unión a maltosa y se purificaron por cromatografía de afinidad, para examinar su capacidad de unión a las regiones reguladoras *perA* y *bfpA* mediante ensayos de cambio en la movilidad electroforética; demostrando que los residuos E116 y D168 muestran actividad diferencial durante la activación de los promotores *bfpA* y *perA*.

Posteriormente, se desarrollaron ensayos de actividad de cloranfenicol acetil transferasa y RT-PCR con las mutantes en las subunidades alfa y sigma de la RNA polimerasa, eligiendo aquellas que disminuyeron la expresión de *bfpA-cat* y *perA-cat*.

Demostramos que los residuos EA574, IA590, EA591, RA596 y KA597 de la subunidad de la RNAP disminuyen la expresión de *perA*. Los residuos E261A, R265A, E273A y H276A de la subunidad de la RNAP redujeron la expresión de *bfpA*.

Los resultados observados mostraron que PerA puede actuar como un activador transcripcional ambidiestro, tal como SoxS (Jair *et al.* 1996), interactuando con la subunidad sigma durante la activación de *perA* y con la subunidad alfa durante la activación de *bfpA*.

Para complementar este trabajo se elaboraron los probables modelos de regulación y la predicción de la estructura secundaria de PerA, con la finalidad de identificar residuos aminoácidos expuestos, que pudieran interactuar con la RNA polimerasa.

Palabras clave: Activador transcripcional, activador ambidiestro, subunidades alfa y sigma.

ABSTRACT

This research includes, the Enteropathogenic *Escherichia coli* characterization of the transcription activator protein PerA mutants, which possibly interact with RNA polymerase; as well as, RNA polymerase alpha and sigma subunits mutants, which could be involved in the interaction with PerA, for *bfp* and *per* operons activation.

It was performed transcriptional activity assays, through the enzymatic assay of chloramphenicol acetyl transferase, to quantify the promoter strength of *bfpA* and *perA* promoters. In the first part, in presence of PerA mutants were selected those mutants that reduced significantly the expression of one or both promoters.

Selected mutants were fused to maltose binding protein and purified by affinity chromatography, to examine its binding capacity to *perA* and *bfpA* regulatory regions through electrophoretic mobility shift assays; proving that E116 and D168 residues show differential activities during *bfpA* and *perA* promoters activation.

Then, were developed chloramphenicol acetyl transferase assays and RT-PCR with RNA polymerase alpha and sigma subunits, choosing those that decreased *bfpA-cat* and *perA-cat* expression.

We demonstrate that residues EA574, IA590, EA591, RA596, and KA597 of RNAP subunit decrease the expression of *perA*. Residues E261A, R265A, E273A, and H276A of RNAP subunit reduce the expression of *bfpA*.

The observed results showed that PerA could act as an ambidextrous transcriptional activator, such as SoxS (Jair *et al.* 1996), interacting with the sigma subunit during *perA* activation, and with the alpha subunit during *bfpA* activation.

To complement this work, were prepared the regulation models likely and the secondary structure prediction of PerA, in order to identify exposed amino acid residues, that could interact with RNA polymerase.

Our findings demonstrate that PerA E116 and PerA D168 are differential activators during *bfpA* and *perA* promoters activation.

Keywords: Transcriptional activator, ambidextrous activator, alpha and sigma subunits

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	IV
Abstract	V
Listas de figuras y de tablas	3
Abreviaturas	5
I. Introducción	10
A. Patofisiología de la infección	11
1. <i>Adherencia Localizada</i>	13
2. <i>Transducción de señales</i>	14
3. <i>Adherencia íntima</i>	16
II. Factores de virulencia de epec	20
<i>Factores de virulencia expresados en EPEC, directamente involucrados en la patogénesis:</i>	22
III. Regulación transcripcional	29
IV. Reguladores transcripcionales arac/xyls	40
A. Reguladores (TF) Arac/Xyls involucrados en la utilización de azúcares	41
AraC	42
B. Reguladores (TF) de la familia AraC/XylS relacionados con la respuesta a estrés	43
SoxS	43
C. Reguladores (TF) de la familia AraC/XylS involucradas en la producción de factores de virulencia ...	44
ToxT	44
PerA	47
V. Antecedentes	49
A. Planteamiento del problema	50
VI. Hipótesis y objetivos	52
Hipótesis	52
Objetivos	52
<i>General</i>	52
<i>Particulares</i>	52
<i>Específicos</i>	53
VII. Metodología	54
Estrategia experimental	54
<i>Evaluación de mutaciones puntuales en PerA y su efecto sobre la activación transcripcional de los operones bfp y per.</i>	54

<i>Efecto de mutaciones en PerA sobre la actividad transcripcional de bfpA y perA bajo diferentes condiciones ambientales.</i>	55
<i>Efecto de las mutaciones en las subunidades τ y τ^{70} de la RNAP sobre la capacidad de PerA para activar la expresión de bfpA o de perA.</i>	55
VIII. Materiales y métodos	57
IX. Resultados	70
Evaluación de mutaciones puntuales en PerA y su efecto sobre la activación transcripcional sobre los operones <i>bfp</i> y <i>per</i>	70
Interacción de las proteínas mutantes de PerA con las regiones reguladoras de <i>bfpA</i> y <i>perA</i>	77
Efecto de mutaciones en <i>perA</i> sobre la actividad transcripcional de <i>bfpA</i> y <i>perA</i> bajo diferentes condiciones ambientales	81
Efecto de mutaciones en las subunidades α y σ^{70} de la rnap sobre la capacidad de PerA para activar la expresión de <i>bfpA</i> o de <i>perA</i>	85
X. Discusión	99
Residuos de aminoácidos en porciones iniciales de los dominios N y C que probablemente están involucrados en la unión a dna en la región reguladora de <i>bfpA</i>, <i>perA</i> o ambos.	101
Activación diferencial de los promotores P_{perA} y P_{bfpA} por mutantes de PerA	103
Las condiciones ambientales regulan la transcripción de <i>perA</i> y de <i>bfpA</i>	106
La subunidad σ^{70} participa en la activación transcripcional del operón <i>perA</i> dependiente de PerA	110
La subunidad α-CTD participa en la activación transcripcional de <i>bfpA</i> y de <i>perA</i>	112
Probables modelos de regulación	115
PerA está formada por α-hélices principalmente	117
XI. Conclusiones	120
XII. Perspectivas	122
XIII. Bibliografía	123
XIV. Apéndices	151
Apéndice I	151
Apéndice II	152
Apéndice III	165
Apéndice IV	169

LISTA DE FIGURAS Y DE TABLAS

Lista de figuras

Figura 1. Mecanismo de patogénesis de EPEC	18
Figura 2. Modelo de la regulación de los factores de virulencia en EPEC	22
Figura 3. Mecanismos moleculares de regulación transcripcional	32
Figura 4. Características estructurales de la familia AraC/XylS	41
Figura 5. La región reguladora del operón <i>araBAD</i> muestra los sitios de unión de AraC	43
Figura 6. Análisis comparativo de la estructura primaria del regulador transcripcional PerA	71
Figura 7. Estructura primaria y secuencia del activador transcripcional PerA	73
Figura 8. Representación esquemática de las proteínas mutantes de PerA y su efecto sobre la actividad transcripcional de los operones <i>bfp</i> y <i>per</i>	75
Figura 9. Purificación de la proteína PerA silvestre	78
Figura 10. Determinación de la capacidad de unión al DNA ... de las proteínas mutantes de PerA	80
Figura 11. Efecto sobre la expresión de <i>bfpA-cat</i> de las mutantes en PerA ante diferentes condiciones ambientales	83
Figura 12. Efecto sobre la expresión de <i>perA-cat</i> de las mutantes en PerA ante diferentes condiciones ambientales	84
Figura 13. Efecto de mutaciones en la subunidad σ de la RNAP sobre la expresión de <i>bfpA</i> dependiente de PerA	90
Figura 14. Efecto de mutaciones en la subunidad σ de la RNAP sobre la expresión de <i>perA</i> dependiente de PerA	91
Figura 15. Efecto de mutaciones en la subunidad α de la RNAP sobre la expresión de <i>bfpA</i> dependiente de PerA	92
Figura 16. Efecto de mutaciones en la subunidad α de la RNAP sobre la expresión de <i>perA</i> dependiente de PerA	93
Figura 17. Expresión del transcrito de <i>bfpA</i> en presencia mutantes de la subunidad α de la RNAP por RT-PCR semicuantitativo	94
Figura 18. Expresión del transcrito de <i>perA</i> en presencia mutantes de la subunidad α de la RNAP por RT-PCR semicuantitativo	95
Figura 19. Predicción de la estructura secundaria de PerA y resumen de los efectos de las mutaciones en cada dominio	97
Figura 20. Mapeo de mutaciones en PerA CTD	98
Figura 21. Activador transcripcional de clase I en el promotor <i>bfpA</i>	115
Figura 22. Activador transcripcional de clase II en el promotor <i>perA</i>	116
Figura 23. Activador transcripcional de clase I en el promotor <i>perA</i>	116
Figura 24. Diagrama de Ramachandran de la proteína AraC	118
Alineamiento de proteínas de la familia AraC/XylS	151
Estructura secundaria de PerA silvestre y mutantes	196

Lista de tablas

Tabla 1. Efectores de EPEC 2348/69 y características funcionales conocidas de las proteínas efectoras	16
Tabla 2. Características y fenotipos de mutaciones en proteínas de la familia AraC/XylS	48
Tabla 3. Cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio	57
Tabla 4. Oligonucleótidos iniciadores utilizados en este estudio	66
Tabla 5. Esquema de estudio de actividad Cat de <i>bfpA</i> y de <i>perA</i> bajo influencia de la RNAP	67
Tabla 6. Lista de mutantes subunidad σ -CTD de la RNAP	67
Tabla 7. Lista de mutantes subunidad α -CTD de la RNAP	68
Tabla 8. Resultados de los ensayos de actividad Cat	165
Tabla 9. Actividad Cat específica bajo tres condiciones de reacción, promedio de 3 ensayos	165
Tabla 10. Actividad Cat específica de la fusión <i>bfpA-cat</i> en presencia de la subunidad σ de la RNAP	166
Tabla 11. Actividad Cat específica de la fusión <i>perA-cat</i> en presencia de la subunidad σ de la RNAP	166
Tabla 12. Actividad Cat específica de la fusión <i>perA-cat</i> en presencia de la subunidad α de la RNAP	167
Tabla 13. Actividad Cat específica de la fusión <i>bfpA-cat</i> en presencia de la subunidad α de la RNAP	168

ABREVIATURAS

A/E	("Attaching-and-Effacing") lesión histopatológica de adherencia y destrucción
RNAP	Subunidad (alfa) de la RNAP
ARP2/3	Complejo 2/3 de la proteína relacionada con actina ("actin-related protein 2/3")
Bfp	("Bundle-forming pilus") pilus formador de mechones
BSA	("Bovine Serum Albumine") albúmina sérica bovina
CAP/CRP	("Catabolite Activator Protein") proteína activadora de catabolitos/proteína receptora de cAMP
Cat	Enzima cloranfenicol acetiltransferasa
[Ca ²⁺]	Concentración de calcio intracelular
Cif	("Cycle-inhibiting factor") Factor de inhibición del ciclo celular
CDC42	Proteína para el control de la división celular 42
CTX	Toxina del cólera
Cx43	Conexina 43 (también conocida como GJA1);
DME	("Dulbecco's modified Eagle") Medio de cultivo para células eucariotas tipo "Eagle" modificado por Dulbecco
DO	Densidad óptica

dsDNA	("Double stranded DNA") DNA de doble cadena
<i>eae</i>	(<i>E. coli</i> "Attaching-and-Effacing") <i>E. coli</i> adherencia y destrucción
EAF	("EPEC Adherence Factor") Factor de adherencia de EPEC
ECP	("E. coli common pilus") Pilus común de <i>E. coli</i>
EMSA	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
<i>esc</i>	("E. coli secretion") <i>E. coli</i> secreción
Esp/ <i>esp</i>	("E. coli secreted proteins") Proteínas secretadas de EPEC
EspC	Proteína autotransportadora de <i>E. coli</i>
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
FeBABE	Hierro- <i>p</i> -bromoacetamidobenzil EDTA
Fis	("Factor for inversion stimulation") Factor de estimulación de la inversión
FPLC	("Fast Performance Liquid Chromatography") Cromatografía líquida de ejecución rápida
GadX	Glutamato decarboxilasa
GAP	("GTPase-activating protein") Proteína activadora de GTP-asa
GST	("Glutathion S-transferase") Glutación S transferasa
H-NS	Proteína estructural tipo histona
HTH	" -helix-turn- -helix"

IHF	(“Integration Host Factor”) factor de integración al huésped
ITP	(“Inositol 1,4,5-triphosphate”) Inositol trifosfato (IP3)
LA	(“Localized Adherence”) Adherencia localizada
LB	Medio Luria-Bertani
LEE	(“Locus of Enterocyte Effacement”) Locus para la destrucción del enterocito
Ler	(“LEE-encoded regulator”) regulador codificado en LEE
LifA	(“Lymphocyte-inhibiting factor”) Factor de inhibición de linfocitos
Lrp	(“Responsive regulatory protein”) Proteína reguladora de respuesta
MBP	(“Maltose Binding Protein”) Proteína de unión a maltosa
Map	(“Mitochondrial-associated protein”) Proteína asociada a mitocondria
Nck	(“non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1”) Región no catalítica de la proteína adaptadora tirosina cinasa 1
NHE3	Intercambiador $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 3 (intercambiador de sodio-hidrógeno 3)
Nir	(“NADH-dependent nitrite reductase”) Nitrito reductasa dependiente de NADH
Nle	(“non-LEE-encoded effectors”) Efectores no codificados por LEE
NleA	Efactor A no codificado por LEE (también conocido como EspI)
NTPs	Nucleótidos trifosfato
N-WASP	(“Neural Wiskott–Aldrich syndrome protein”) Proteína del syndrome

	neural de Wiskott–Aldrich
ORF	(“Open reading frame”) Marco de lectura abierta
PAI	(“Pathogenicity Island”) Isla de patogenicidad
pb	Pares de bases
PBS	(“Phosphate-buffered saline”) Regulador salino de fosfatos
<i>per</i>	(“Plasmid-encoded regulator”) Regulador codificado en plásmido
PKC	(“Protein kinase C”) Proteína cinasa C
RNAP	RNA polimerasa
RT	Temperatura ambiente
RT-PCR	(“Reverse transcription polymerase chain reaction”) Transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SERT	(“serotonin transporter protein”) Transportador de serotonina
RNAP	Subunidad (sigma) de la RNAP
SPATE	(“Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae”) Autotransportadoras de serina proteasa de las Enterobacteriaceae
TCP	(“Toxin-coregulated pilus”) Pilus corregulado por toxina
TJ	(“Tight junctions”) Uniones estrechas
T3SS	(“Type three secretion system”) Sistema de secreción tipo III
TDDT	Tris-ditiotreitol

TF	(“Transcription factor”) Factor de transcripción
TFBSs	(“Transcription factor binding sites”) Sitios de unión para factores de la transcripción
Tir	(“Translocated intimin receptor”) receptor de intimina transferido
CTD/ NTD	Subunidades alfa de los dominios carboxilo y amino terminal de la RNAP (“N-Terminal domain” y “C-terminal domain)

I. INTRODUCCIÓN

Los patovares de *E. coli* son diversos en términos de su presentación clínica, grupos de edad afectados y factores de virulencia asociados. Se han identificado cinco diferentes grupos clínicos de aislados diarreogénicos: *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC) (Kaper *et al.* 2004; Croxen y Finlay, 2010). En general, los aislados de *E. coli* y las enfermedades que causan son diversas y, mientras se conocen muchos factores de virulencia de cada uno de los patovares, en 2008 el contenido genético de estos patógenos aún no se había examinado a nivel genómico (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.* 2004, Rasko *et al.* 2008), sin embargo en 2013, Hazen *et al.*, definen filogenómicamente los diferentes patovares A/E de *E. coli* (AEEC) (Hazen *et al.* 2013).

Uno de los agentes causales más comunes de diarrea infantil en países en vías de desarrollo es *E. coli* enteropatógena (EPEC). Esta provoca una diarrea secretora copiosa y persistente con gran pérdida de líquidos y electrolitos en las heces, mala absorción de nutrimentos e intolerancia alimenticia (Fagundes-Neto y Affonso-Scaletsky, 2000; Kaper *et al.* 2004).

Como se han descubierto varios mecanismos de patogenicidad, la clasificación de EPEC depende de características genéticas específicas, serotipos y propiedades de virulencia. Así se han descrito cepas de EPEC típica y EPEC atípica (Trabulsi *et al.* 2002).

La diferencia entre las cepas típicas y atípicas es el plásmido EAF (“EPEC Adherence Factor”), presente en las cepas típicas (Tobe *et al.* 1999). En los países industrializados es más frecuente encontrar aislamientos de cepas atípicas

de EPEC en casos de diarrea, mientras que cepas típicas de EPEC predominan en los países en vías de desarrollo (Trabulsi *et al.* 2002).

PATOFISIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN

La histopatología intestinal característica asociada con las infecciones por EPEC, se conoce como adherencia y destrucción (A/E, “attaching and effacing”), aunque en la producción de la lesión A/E están involucrados múltiples eventos; en 1992, Donnenberg y Kaper propusieron un modelo de tres estadios que explica la patogénesis de la infección por EPEC: 1) adherencia localizada, 2) transducción de señales y 3) adherencia íntima. Aunque el modelo se ha conservado firme en los avances del conocimiento de la patogénesis por EPEC, no es posible una separación de cada estadio (Donnenberg y Kaper, 1992; Knutton *et al.* 1998; Nataro y Kaper, 1998; Wolff *et al.* 1998; Clarke *et al.* 2003; Kaper *et al.* 2004; Chen y Frankel, 2005).

La bacteria se adhiere íntimamente a las células del epitelio intestinal y provoca cambios drásticos en el citoesqueleto, incluyendo la acumulación de actina polimerizada debajo de la bacteria adherida. Se eliminan las microvellosidades intestinales y surge una estructura tipo pedestal sobre la que la bacteria se ancla. La habilidad para inducir la lesión A/E se encuentra codificada por los genes de una isla de patogenicidad (PAI) de 35 kb llamada locus para la destrucción del enterocito (LEE, “locus of enterocyte effacement”). Uno de los operones de la isla LEE codifica para una proteína de membrana externa llamada intimina que participa en la adherencia íntima de EPEC a las células epiteliales. La intimina no solo funciona como un ligando de adhesión a las células epiteliales, también estimula la respuesta inmune en las mucosas por parte de las células T_H1 y favorece la formación de hiperplasia en las criptas intestinales. La mayoría de los 41 marcos de lectura abierta (ORF, “open reading frame”) de la parte central de

LEE, codifican para un sistema de secreción tipo tres (T3SS, “type III secretion system”), que traslada proteínas efectoras bacterianas al interior del citoplasma de la célula hospedera. Siete proteínas efectoras son codificadas por LEE y hay varios efectores no codificados por LEE (Nle), pero se desconocen las funciones de muchos de estos efectores (Nataro y Kaper, 1998; Croxen y Finlay, 2010). Sin embargo, una de estas proteínas efectoras, conocida como receptor transferido de la intimina (Tir, “translocated intimin receptor”), es insertada en la membrana celular del hospedero mediante el T3SS, donde funciona como receptor de la intimina (Kenny *et al.* 1997a; Abe *et al.* 1999; Kaper *et al.* 2004).

Por otra parte, el inducir la formación de ondulaciones membranales o lamelipodios es un mecanismo empleado por diferentes bacterias patógenas para la invasión celular. Bulgin *et al.* (2009), demostraron que EPEC es capaz de conducir la remodelación de la membrana celular a través de EspT de forma similar a la formación de pliegues por parte de *Shigella* y de *Salmonella* (Yoshida y Sasakawa, 2003; Cossart y Sansonetti, 2004), a la vez que conserva la capacidad de formar múltiples pedestales dentro de las vacuolas formadas por el cierre de los lamelipodios (Bulgin *et al.* 2009).

La infección con EPEC genera un aumento del nivel de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]$) de las células hospederas, esto causa una reducción de la polimerización de actina y la formación de la lesión A/E. Además de inhibir la absorción de Na^+ y de Cl^- y de estimular la secreción de cloruro en los enterocitos, sugiriendo que dichos cambios en los niveles de $[Ca^{2+}]$ median la respuesta secretora intestinal inducida por EPEC (Kaper *et al.* 2004).

A continuación se describirán brevemente los 3 estadios de la patogénesis por EPEC:

1. ADHERENCIA LOCALIZADA. (LA, “Localized Adherence”). Comienza con la unión no íntima de EPEC a los enterocitos del intestino delgado por medio de un pilus tipo IV llamado pilus formador de mechones (Bfp, “Bundle-forming pilus”) (Girón *et al.* 1991). Estos son fimbrias tipo cordón que interactúan, tanto con otras bacterias EPEC para formar microcolonias para la adherencia localizada, como con receptores que contienen *N*-acetil-lactosamina en la superficie de la célula hospedera (Hyland *et al.* 2008). El Bfp está codificado en el plásmido EAF (“EPEC Adherence Factor”) de 60 MDa (Tobe *et al.* 1999), del que un grupo de 14 genes, bajo condiciones ambientales adecuadas lo expresa y ensambla.

Estos genes están en el operón *bfp* formado por: *bfpA*, *bfpB*, *bfpC*, *bfpD*, *bfpE*, *bfpF*, *bfpG*, *bfpH*, *bfpI*, *bfpJ*, *bfpK*, *bfpL*, *bfpP* y *bfpU* (Ramer *et al.* 2002; Clarke *et al.* 2003; Hwang *et al.* 2003). Los mismos son necesarios para la síntesis de una fimbria de adherencia tipo IV, similar a la producida por ETEC, *Salmonella* enterica serovar typhi y *Vibrio cholerae*. El gen *bfpA* codifica para la bundlina, *bfpP* codifica una peptidasa necesaria para el corte de la prebundlina, también interviene en la biogénesis de *bfp* y en la LA. Por otra parte, BfpG y BfpB forman un complejo de membrana externa tipo secretina, mientras que BfpC, BfpI, BfpJ, BfpK y BfpL constituyen un componente de membrana interna con la subunidad mayor de la pilina. BfpU conforma un componente periplásmico entre la bundlina y la pilina. BfpE, además de estabilizar los otros componentes, forma una plataforma de membrana interna para el ensamble del complejo y es responsable del transporte de otras proteínas del complejo a través de la membrana interna. Mientras que BfpF se necesita para la dispersión de los autoagregados del filamento de la fimbria. De la proteína BfpH se desconoce su función (Ramer *et al.* 2002; Clarke *et al.* 2003; Hwang *et al.* 2003).

El plásmido EAF también contiene el locus *per* (“plasmid-encoded regulator”), cuyos productos regulan el operon *bfp* y a la mayoría de genes en LEE a través del regulador Ler (“LEE-encoded regulator”). La síntesis de BFP además necesita del gen cromosómico *dsbA* que codifica una enzima periplásmica que regula la formación de enlaces disulfuro (Nataro y Kaper, 1998). Por otro lado, se ha demostrado que en este proceso también participan el pilus común de *E. coli* (ECP, “*E. coli* common pilus”), en conjunto con los Bfp para estabilizar las interacciones entre EPEC y la célula hospedera (Saldaña *et al.* 2009; Croxen y Finlay, 2010). El resultado es la pérdida de las microvellosidades celulares y la adherencia entre la bacteria y la membrana de la célula epitelial (Kaper *et al.* 2004).

2. **TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.** EPEC utiliza el T3SS para inyectar un gran repertorio de efectores bacterianos (Tabla 1) rápidamente en el citoplasma de la célula hospedera, posiblemente mediante un proceso de percepción de Ca^{2+} (Swimm y Kalman, 2008). Uno de ellos es Tir, que queda expuesto en la superficie de la célula hospedera y actúa como receptor de la intimina. Las interacciones con la intimina conducen a la fosforilación de Tir por diferentes tirosin-cinasas del hospedero. La fosforilación de Tir recluta a la proteína adaptadora Nck (“non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein”) al sitio de unión, y este activa a N-WASP (“Neural Wiskott–Aldrich syndrome protein”) y al complejo ARP2/3 (“actin-related protein 2/3”) para inducir y controlar los rearreglos de actina y la formación del pedestal (Kalman *et al.* 1999) (Figura 1). La activación de PKC (“protein kinase C”) induce cambios en la secreción de electrolitos y agua *in vivo* e *in vitro*. De esta forma, la transducción de señales inducida en las células epiteliales por EPEC activa a este receptor e induce cambios en el citoesqueleto, regula el sistema inmune

favoreciendo la migración de leucocitos polimorfonucleares y la activación de la transcripción del factor NF- κ B produciendo inflamación y como consecuencia la diarrea (Figura 1). Muchos de los efectores bacterianos tienen múltiples funciones; como Map (“Mitochondrial-associated protein”), que pertenece a la familia de proteínas que comparten el motivo WXXXE e imita la forma activa de la proteína CDC42 (“cell division control 42”), una proteína G pequeña (Alto *et al.* 2006). Recientemente se demostró que Map actúa como un factor de intercambio de guanina para CDC42, regulando la dinámica de la actina (Croxen y Finlay, 2010; Huang *et al.* 2009) y contribuyendo a la formación de filopodios que rodean a las microcolonias bacterianas (Alto *et al.* 2006). Map también hace blanco en las mitocondrias donde altera la estructura y función mitocondrial (Ma *et al.* 2006; Croxen y Finlay, 2010) (Figura 1). Un segundo efector multifuncional es EspF, que hace de su blanco a la mitocondria y dispara el mecanismo de apoptosis por la vía de la mitocondria. EspF (Nougayrède y Donnenberg, 2004), también se ha implicado en la inhibición de la fagocitosis (Quitard *et al.* 2006) y alteración de las uniones estrechas (Guttman *et al.* 2006), así como, en la imitación de las vías de señalización de la célula hospedera que participan en el tráfico de membranas (Croxen y Finlay, 2010) (Figura 1). EspB tiene un doble papel, como proteína de translocación del T3SS y como un efector que evita la fagocitosis (Croxen y Finlay, 2010). Las proteínas Nle participan en la virulencia. Por ejemplo, NleA (EspI) disminuye el tráfico de proteínas y altera las uniones estrechas; EspJ inhibe la opsonofagocitosis de los eritrocitos por parte de los macrófagos (Marchès *et al.* 2008); y el factor de inhibición del ciclo celular (Cif) es una calmodulina que evita el progreso del ciclo celular e induce la apoptosis de los enterocitos (Figura 1). Se han identificado otras proteínas Nle, pero faltan de caracterizar (Croxen y Finlay, 2010).

Tabla 1. Efectores de EPEC 2348/69 y características funcionales conocidas de las proteínas efectoras

Efectores de EPEC	Localización	Función celular o fisiológica	Molécula copartícipe del hospedero
Tir	LEE	Polimerización de actina Ruptura de uniones celulares estrechas Eliminación de microvellosidades	Nck
Map	LEE	Ruptura de uniones celulares estrechas Formación de filopodios Disfunción mitocondrial Eliminación de microvellosidades	Cdc42
EspF	LEE	Apoptosis Ruptura de uniones celulares estrechas Eliminación de microvellosidades Alargamiento de microvellosidades Disfunción mitocondrial Maduración del pedestal Inhibición de la actividad del intercambiador de sodio-hidrógeno 3 (NHE3)	ARP 2/3 N-WASP NHE3 Cotransportador 1 sodio-D-glucosa (SGLT1)
EspG	LEE	Ruptura de microtúbulos Ruptura de uniones celulares estrechas Redistribución de acuaporina Altera la actividad del proceso de intercambio Cl ⁻ /OH ⁻	Tubulina Acuaporina Intercambio Cl ⁻ /OH ⁻
NleA	PP6	Inhibición de secreción de proteínas	
EspJ	PP2	Antifagocitosis	
Cif	PP2	Inhibición del ciclo celular Apoptosis	

LEE, "Locus of Enterocyte Effacement" (Locus para la destrucción del enterocito); PP "prophages" (profagos). Todos los efectores se encuentran en el cromosoma en las islas de patogenicidad especificadas en Iguchi *et al.* 2009. Las referencias pueden encontrarse en Dean *et al.* 2005. Tabla tomada de Dean y Kenny, 2009.

3. ADHERENCIA ÍNTIMA. La adherencia íntima está mediada por interacciones entre la proteína de membrana externa íntima (codificada

por el gen *eae*), y el receptor de intimina traslocado (Tir, “translocated intimin receptor”) (Croxen y Finlay, 2010). Resultando en una adherencia íntima, con acumulación de actina polimerizada y de otros elementos del citoesqueleto, por debajo del sitio de adherencia de la bacteria. Esto favorece la formación de la estructura tipo “pedestal” característica de EPEC, sobre la que las bacterias se posan (Figura 1). Otras proteínas del citoesqueleto que participan en la formación del pedestal son vinculina, cortactina, talina y α -actinina (Vallance y Finlay, 2000). La formación del pedestal es un proceso dinámico, ya que esta estructura puede moverse en la superficie celular (“surf”) mediante las proteínas cofilina, gelsolina y profilina (Bhavsar *et al.* 2007), debido a que se observó que la fuerza de la polimerización de actina, puede impulsar los pedestales a través de la superficie de las células epiteliales ptk2 (Kaper *et al.* 2004). También Tir tiene un motivo GAP (proteína activadora de GTP-asa, “GTPase-activating protein”), que proporciona a Tir la capacidad de desregular la formación de filopodios. Otra proteína efectora secretada es EspF, que causa apoptosis e induce la redistribución de la proteína ocludina asociada a las uniones estrechas, que a su vez, provoca la pérdida de resistencia eléctrica trans-epitelial (McNamara *et al.* 2001). La proteína Map afecta la función mitocondrial y la formación de filopodios; además, se han descrito otras proteínas efectoras como EspG y EspH y, otros factores de virulencia de EPEC codificados fuera de LEE, como una proteína de ~385 kDa llamada linfoestatina (LifA) que inhibe la activación de linfocitos (Klapproth *et al.* 2000; Kaper *et al.* 2004). Se activan las cinasas, proteína cinasa C (PKC), fosfolipasa C, para la cadena ligera de miosina y para la proteína activada por mitógeno (MAP). Esto provoca efectos en cadena, incluyendo un aumento de la permeabilidad debido a la pérdida de uniones estrechas en las células hospederas. Se activa el factor nuclear (NF)- κ B, que induce la producción de IL-8 y una respuesta inflamatoria que involucra la transmigración de leucocitos

polimorfonucleares (PMN) a la superficie luminal y la activación del receptor de adenosina. El receptor de galanina-1 es activado en exceso, por lo que aumenta la respuesta de las células epiteliales al neuropéptido Galanina, que es un importante mediador de la secreción intestinal del flujo de iones (Kaper *et al.* 2004). Algunas cepas típicas de EPEC producen una enterotoxina, EspC que aumenta la corriente de cortocircuito en cámaras Ussing (Mellies *et al.* 2001). Por lo tanto, la diarrea resulta de la activación de múltiples mecanismos que conducen a la secreción activa de iones, el incremento de la permeabilidad intestinal, la inflamación intestinal y la pérdida de superficie de absorción debido a la destrucción de las microvellosidades (Kaper *et al.* 2004).

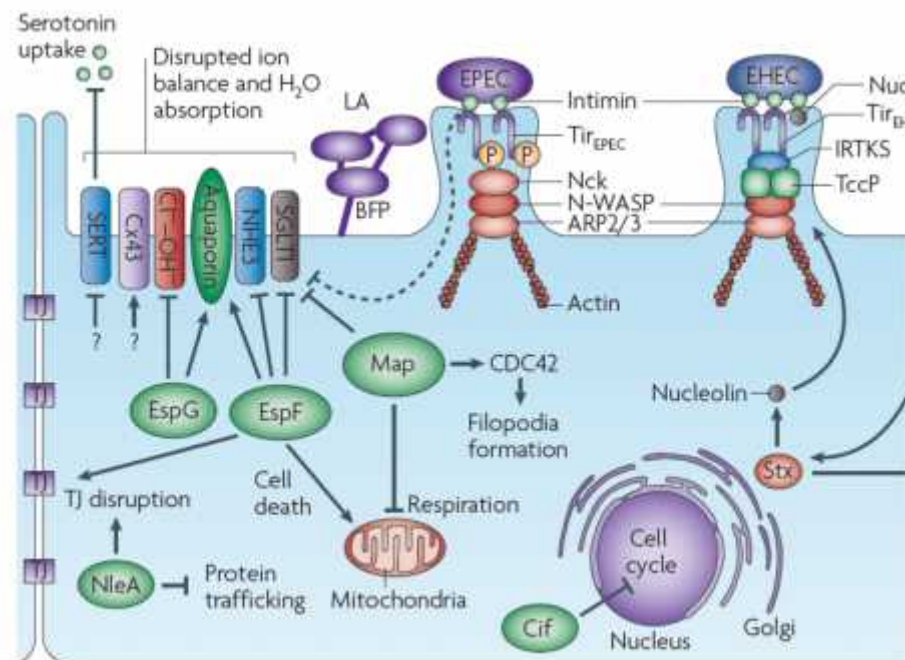


Figura 1. Mecanismo de patogénesis de EPEC. EPEC es uno de los patógenos A/E que elimina las microvellosidades y altera la actina de la célula hospedera para formar pedestales por debajo del sitio de adhesión. Los efectores secretados por el T3SS pueden afectar la actividad de las bombas Cl⁻/OH⁻ y Na⁺-H⁺, cambian la ubicación de las aquaporinas e inhiben al cotransportador de

sodio-d-glucosa 1 (SGLT1). EPEC se adhiere al intestino delgado a través de Bfp, formando adhesiones localizadas (LA). La adherencia íntima está mediada por la interacción entre la intimina y Tir. Una tirosina cinasa del hospedero fosforila a Tir, Tir fosforilado recluta a Nck, que activa a las proteínas N-WASP y Arp2/3 para mediar los rearrreglos de actina y la formación del pedestal. Por medio del T3SS, codificado por LEE, se inyectan un gran conjunto de proteínas efectoras en la célula hospedera, trastornando las vías de señalización de la célula hospedera. CDC42, proteína para el control de la división celular 42; Cx43, conexina 43 (también conocida como GJA1); Cif, factor de inhibición del ciclo celular; Map, proteína asociada a mitocondria; NHE3, intercambiador $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 3; NleA, efector A no codificado por LEE (también conocido como Espl); SERT, transportador de serotonina; TJ, uniones estrechas. (Tomado de Croxen y Finlay, 2010).

II. FACTORES DE VIRULENCIA DE EPEC

Los elementos clave en la patogénesis de muchas bacterias son, una estricta regulación negativa de los genes de virulencia y su subsiguiente expresión en respuesta a las condiciones ambientales. Los problemas de una expresión inadecuada de los genes de virulencia son: que es metabólicamente caro para la bacteria infecciosa y que puede alertar a los sistemas de defensa del huésped antes de que la bacteria logre la colonización (Clarke *et al.* 2003).

En EPEC los genes de virulencia están controlados por una cascada de regulación (Sohel *et al.* 1996; Tobe *et al.* 1996; Elliott *et al.* 1998; Tobe *et al.* 1999; Friedberg *et al.* 1999; Sánchez-San Martín *et al.* 2001; Clarke *et al.* 2003; Kaper *et al.* 2004; Chen y Frankel, 2005; Dean *et al.* 2005), aún no definida en su totalidad, en la que participan:

1. Reguladores codificados en el plásmido EAF (“EPEC Adherence Factor”):
 - El operón *bfp* para la biogénesis de los Bfp (“Bundle-forming pili”) responsables total o parcialmente del fenotipo LA,
 - El operón *perABC* (*per*, “plasmid-encoded regulator”) integrado por los genes reguladores necesarios para la transcripción de *bfp* y para la activación transcripcional del gen *eae* localizado en la isla de patogenicidad LEE (“Locus of Enterocyte Effacement”);
2. Reguladores codificados en la isla de patogenicidad LEE:
 - Genes para formación de la lesión A/E y para el sistema de secreción tipo III; contiene 41 marcos de lectura abierta (ORF) organizados en por lo menos cinco operones policistrónicos, *LEE1* a *LEE5* más R1/R2.

La expresión de *perA* y de los Bfp está regulada por factores ambientales como son: la concentración de amonio, la temperatura, el medio de crecimiento y

la osmolaridad. Mientras que la expresión de *bfpA* está regulada positivamente por los productos de los genes del operón *per*, principalmente por la proteína PerA y por IHF (“Integration Host Factor”) y negativamente por GadX (glutamato decarboxilasa) y H-NS (proteína estructural tipo histona) (Tobe *et al.* 1996; Puente *et al.* 1996; Martínez-Laguna *et al.* 1999; Bustamante *et al.* 2001; Shin *et al.* 2001; Clarke *et al.* 2003).

La histopatología A/E inducida por EPEC y EHEC se encuentra en el locus LEE, que contiene 5 operones policistrónicos *LEE1-5*. La expresión de los genes *LEE* está regulada por reguladores específicos de EPEC y reguladores genéricos de *E. coli*. El primer ORF del operón *LEE1* codifica el regulador Ler, que regula positivamente la expresión de los otros operones *LEE* al contrarrestar el efecto represor de H-NS (Mellies *et al.* 1999; Sperandio *et al.* 1999; Bustamante *et al.* 2001; Kaper *et al.* 2004). Ler también regula la expresión de la enterotoxina EspC y genes que codifican diferentes tipos morfológicos de fimbrias. La expresión de Ler es regulada por varios factores incluyendo IHF, FIS y BipA (Friedberg *et al.* 1999; Sperandio *et al.* 2000; Goldberg *et al.* 2001; Grant *et al.* 2003; Kaper *et al.* 2004) y por “quórum sensing” a través de QseA. El “quorum sensing” también regula otros factores que están potencialmente involucrados en virulencia, por ejemplo los flagelos a través del regulador de dos componentes QseBC (Sperandio *et al.* 2002).

En EPEC, la expresión de Ler es regulada positivamente por los productos del locus *per* que consiste en tres ORF *perA*, *perB* y *perC*. Sin embargo la proteína PerA, que se autorregula, produciendo PerC activa a *LEE1* cuyo producto Ler (“LEE-encoded regulator”) actúa sobre los promotores de *LEE2*, *LEE3* y *LEE5*, y los promotores *tir* y *orf19* (Haack *et al.* 2003; Porter *et al.* 2004; Kaper *et al.* 2004). PerA también regula los genes *bfp* que codifican un pilus tipo IV. En condiciones ácidas, los genes *per* son reprimidos por GadX, que activa a los genes *gadAB* involucrados en resistencia ácida (Shin *et al.* 2001; Kaper *et al.* 2004). Esta acción dual de GadX puede evitar la expresión prematura en el estómago de los factores

de virulencia y aumenta la sobrevivencia del organismo hasta que alcanza condiciones más alcalinas en el intestino delgado donde se induce la expresión de los factores de virulencia (Figura 2) (Kaper *et al.* 2004).

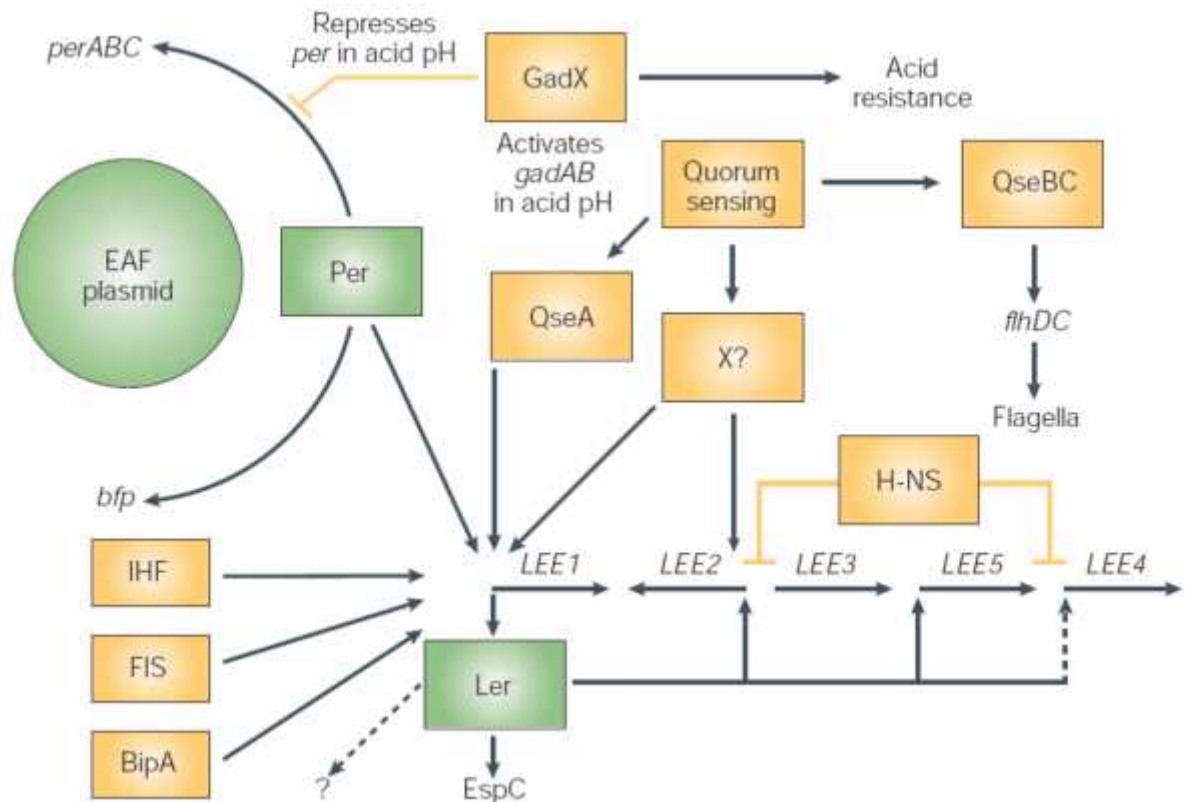


Figura 2. Modelo de la regulación de los factores de virulencia en EPEC. Utiliza tanto reguladores presentes sólo en cepas patógenas (en verde) como reguladores presentes en todas las cepas de *E. coli*, comensales y patógenas (en amarillo). Bip, proteína de unión a la cadena pesada de Ig; FIS, factor para la estimulación de inversión; IHF, factor de integración al hospedero. Dibujo tomado de Kaper *et al.* 2004.

FACTORES DE VIRULENCIA EXPRESADOS EN EPEC, DIRECTAMENTE INVOLUCRADOS EN LA PATOGÉNESIS:

EAF: (“EPEC adherence factor”), plásmido de 50-70 MDa, necesario para el desarrollo de la adherencia localizada por EPEC, no así, para la lesión A/E. Se

demostró que EAF es importante para la patogenicidad de los serogrupos O, conocidos como clase I (055, 0111, 0119, 0127, 0128 y O142), ya que las cepas EPEC de clase II carecen de EAF (Levine *et al.* 1985). Contiene los genes que codifican el pilus tipo IV (Bfp) y el regulador de virulencia *per* (Brinkley *et al.* 2006).

Intimina: proteína de membrana externa de 94 kDa codificada en LEE por el gen *eae*, necesaria para la adhesión íntima a las células epiteliales, para la reorganización del citoesqueleto y para virulencia en adultos voluntarios (Jerse *et al.* 1990; Donnenberg *et al.* 1993). Pertenece a una familia de adhesinas relacionadas con las invasinas de *Yersinia enterocolítica* y *Y. pseudotuberculosis*. El extremo amino de la intimina, altamente conservado, ancla la proteína en la membrana externa de EPEC. El extremo carboxilo, extracelular, es divergente y está involucrado en el reconocimiento de receptor (Frankel *et al.* 1994). La unión de la intimina a Tir y a un receptor codificado por la célula hospedera puede estar involucrada en el tropismo tisular, particularmente si ocurre previo a la cascada de eventos de la lesión A/E (Phillips y Frankel, 2000). Provocando dramáticos cambios intracelulares como la reorganización de las proteínas del citoesqueleto, la polimerización de actina en el sitio de contacto y formación de la lesión A/E (Nougayrède *et al.* 2003). Variaciones en la secuencia del extremo carboxilo definen por lo menos nueve subtipos de intimina, α (alfa) a ζ (zeta) (Adu-Bobie *et al.* 1998; Oswald *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2002). La divergencia del dominio carboxilo terminal probablemente se deba a recombinación y presión de selección, debida a la selección natural para escapar de la respuesta inmune del hospedero o a cambios de adaptación en el tropismo tisular (Tarr y Whittam, 2002). Este dominio forma un bastón rígido alargado, formado por tres dominios tipo inmunoglobulina y un dominio tipo lectina. Por medio de análisis de secuencia se ha observado que este segmento extracelular está unido al dominio N insertado en la membrana por un conector flexible (formado por dos residuos de glicina), que actúa a modo de bisagra entre el bastón y la membrana externa. El análisis de la

secuencia del extremo amino sugiere que se encuentra plegado en forma de barril formando una estructura tipo porina que permite la translocación de la membrana externa y la exposición a la superficie del dominio C terminal (Wentzel *et al.* 2001; Nougayrède *et al.* 2003).

Linfostatina: proteína codificada por el gen *lifA* que está localizado fuera del operón LEE, es una toxina de ~385 kDa, contiene una secuencia similar a la glicosiltransferasa de las citotoxinas grandes de *Clostridium* ssp. Participa en la adherencia, inhibe la función de múltiples linfocinas, incluyendo IL-2, IL-4 e interferón- γ , a nivel de la transcripción e inhibe la proliferación de linfocitos (Klapproth *et al.* 1996; Malstrom y James, 1998; Klapproth *et al.* 2000; Nougayrède *et al.* 2003).

EspC: proteasa autotransportadora de 110 kDa codificada por el gen *espC* localizado dentro de una isla de patogenicidad en el minuto 60 del cromosoma, que no necesita del T3SS para su exportación, miembro de la familia SPATE (autotransportadoras de serina proteasa de las Enterobacteriaceae). En algunas cepas de EPEC puede ser un factor de virulencia accesorio (Stein *et al.* 1996; Mellies *et al.* 2001).

T3SS: codificado en la isla de patogenicidad LEE de 35 kb. Se aprecia como un gran apéndice filamentoso de EPEC que parece hacer contacto directo entre EPEC y la membrana de la célula hospedera. La mayoría de los T3SS carecen de una estructura similar. Compuesto por un cuerpo basal, un corto cuello delgado y una aguja, similar al encontrado en *Salmonella* y en *Shigella*. La longitud de la aguja varía de 50 nm a más de 600 nm (Ide *et al.* 2001; Sekiya *et al.* 2001); a diferencia de la aguja de *Shigella* y de *Salmonella*, la aguja de EPEC está

asociada con componentes que forman una estructura tipo vaina, con EspA como su principal componente (Daniell *et al.* 2001; Sekiya *et al.* 2001). Otras proteínas son EspB y EspD, secretadas vía el T3SS de forma dependiente de EspA. Forman un poro en la membrana de la célula hospedera constituyendo la punta de la aguja, son necesarias para la secreción de proteínas efectoras y para la formación de la lesión A/E (Kenny *et al.* 1997b; Abe *et al.* 1998; Clarke *et al.* 2003). Wilson y colaboradores demostraron que EspA en realidad forma una cubierta o vaina sobre la estructura de aguja que está conformada por EscF y ambas interactúan directamente (Daniell *et al.* 2001; Sekiya *et al.* 2001). Las funciones del T3SS son inyectar Tir y otras moléculas efectoras al interior de la célula hospedera, activar por medio de las moléculas efectoras las vías de señalización y alterar el citoesqueleto de la célula hospedera provocando la despolarización de actina y la pérdida de las microvellosidades (Frankel *et al.* 1998; Clarke *et al.* 2003).

Cif: (“cycle inhibiting factor”), proteína efectora secretada a través del T3SS, no codificada por LEE, sino por un profago . Bloquea la transición del ciclo celular de G₂ a M por medio de la inactivación de Cdk1 fosforilado e induce la formación de fibras de estrés por medio del reclutamiento de adhesiones focales (Marchès *et al.* 2003).

EspA: proteína efectora de 25 kDa secretada a través del T3SS del que forma parte, como una estructura filamentosa en la superficie bacteriana durante la etapa temprana de formación de la lesión A/E. Forma un puente entre la bacteria y la célula hospedera infectada, participa en la exportación de EspB y EspD (Abe *et al.* 1998; Knutton *et al.* 1998; Daniell *et al.* 2001; Sekiya *et al.* 2001).

EspB: proteína de 37 kDa, codificada por el gen *espB* en el operón LEE4, secretada a través del T3SS a través de EspA; después del contacto EspB es insertada dentro de la membrana formando un poro junto con EspD, constituyendo el extremo de la jeringa molecular (Rosenshine *et al.* 1996; Clarke *et al.* 2003), además EspB se requiere para la translocación de Tir en el citoplasma de la célula hospedera, donde probablemente actúe como una toxina del citoesqueleto provocando su redistribución. Se ha demostrado que EspB interactúa con una proteína del citoesqueleto de la célula hospedera, -catenina, que a su vez es reclutada al sitio de acumulación de actina de forma dependiente de EspB (Kodama *et al.* 2002; Clarke *et al.* 2003).

EspD: proteína de 39 kDa codificada por el gen *espD* en el operón LEE4 y secretada a través del T3SS igual que EspB, a través del filamento formado por EspA, para formar un poro junto con EspB en la membrana de la célula hospedera y permitir el deslizamiento de otros efectores en el interior de la célula y, probablemente actúen como efectores ellos mismos (Wachter *et al.* 1999).

EspF: codificada por el gen *espF* en el extremo derecho de LEE, es una proteína rica en prolina de 21 kDa que necesita del T3SS para ser insertada en el interior de la célula hospedera, aunque, EspF no se necesita para la formación de la lesión A/E (McNamara y Donnenberg, 1998; Clarke *et al.* 2003) si participa en aumentar la permeabilidad de las uniones estrechas (McNamara *et al.* 2001), induciendo la redistribución de la ocludina. También induce la muerte celular (Crane *et al.* 2001; Clarke *et al.* 2003).

Esp G: codificada por el gen *espG* al principio de LEE1, se desconoce su función, aunque presenta una secuencia similar a *espC* y a VirA de *Shigella*.

EspH: codificada por el gen *espH* del *orf18* de LEE. Secretada por el T3SS y se ubica por debajo de las microcolonias de EPEC. Regula la formación de filopodios y del pedestal (Tu *et al.* 2003).

Map: (“mitochondria-associated protein”), producto de 203 aminoácidos del *orf19*; se localiza dentro de la célula, alrededor de la mitocondria aunque no se descarta que penetre a la mitocondria una porción (Kenny y Jepson, 2000), alterando el potencial de membrana, de la misma forma en que muchos patógenos inducen apoptosis (Boya *et al.* 2001). Sin embargo, debido a que se han observado en infecciones experimentales de EPEC apoptosis y necrosis, es posible que Map tenga un papel antiapoptótico (Kenny, 2002). Entre sus funciones está el participar en los rearrreglos del citoesqueleto y favorecer la formación de filopodios durante la etapa temprana de la infección en forma dependiente de la proteína GTPasa Cdc42 (Kenny *et al.* 2002).

NleA/EspI: (“non-locus-of-enterocyte-effacement-encoded effector A”), proteína secretada vía el T3SS, de función desconocida, se localiza junto a la Golgi-manosidasa II (Mundy *et al.* 2004).

NleC y NleD: proteínas secretadas a través del T3SS, se desconoce su función en los rearrreglos del citoesqueleto (Marchès *et al.* 2005).

Tir: Proteína de ~90 kDa codificada por LEE, introducida en la célula hospedera por medio del T3SS (Kenny *et al.* 1997a) y funciona como receptor de la intimina (Kenny *et al.* 1997a; Clarke *et al.* 2003). Una vez en el interior se

fosforila en el residuo Y₄₇₄ (Kenny, 1999; Campellone *et al.* 2002; Gruenheid *et al.* 2001) y, se inserta en la membrana con el dominio de unión a la intimina en forma de asa en posición extracelular (De Grado *et al.* 1999; Hartland *et al.* 1999; Kenny, 1999); y, los extremos N y C en el citoplasma para interactuar con las proteínas hospederas. Entre las proteínas que interactúan directamente con Tir (Goosney *et al.* 2001) se encuentra Nck, que participa en el inicio de la señalización de actina y se une a los aminoácidos adyacentes al residuo fosforilado de Tir, Y₄₇₄ (Campellone *et al.* 2002; Gruenheid *et al.* 2001). Tir es necesaria para la formación de la lesión A/E debido a que Nck recluta a N-WASP y Arp2/3 en la punta de los pedestales donde enuclean actina y estimulan la formación de filamentos de actina; otras proteínas que interactúan con Tir son vinculina (Clarke *et al.* 2003), cortactina (Cantarelli *et al.* 2001), talina (Cantarelli *et al.* 2001, Clarke *et al.* 2003) y -actinina (Clarke *et al.* 2003), las últimas tres son esenciales para la formación del pedestal.

Isla de patogenicidad EspC: es una enterotoxina de 110 kDa, se ubica en el cromosoma, de 15 kb, contiene dos genes asociados a virulencia, *espC* y *orf3* (favorece alteración en la red de microtubulos), varios ORF similares a elementos genéticos móviles y un *orf* putativo que codifica proteínas reguladoras; *espC* PAI se presenta sólo en algunos linajes de EPEC. Funciona como un factor de virulencia accesorio. Pertenece a la familia de proteínas autotransportadoras (T3SS) con actividad de serina proteasa (Mellies *et al.* 2001; Schmidt y Hensel, 2004).

III. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

Cualquier etapa de la expresión genética puede ser regulada, desde la transcripción DNA-RNA hasta la modificación postraduccional de una proteína (Levine).

En las bacterias, la regulación de la transcripción es necesaria para que la célula se adapte rápidamente a los cambios ambientales. La presencia o la cantidad y tipo de nutrientes determina cuales genes se expresan; esto es, los genes deben ser regulados de alguna forma, especialmente considerando que la complejidad de la regulación genética comienza principalmente a nivel de la transcripción y ciertos eventos post-transcripcionales (Choudhuri, 2004).

El componente central en la regulación de la transcripción en bacterias es la RNA polimerasa (RNAP), enzima multifuncional compleja de ~465 kDa (Puertas, 1999; Murakami *et al.* 2002). El núcleo de la enzima (*core*), es competente para la transcripción pero no para iniciarla, está formado por las subunidades α y β ; cada una de las dos subunidades α consiste de dos dominios independientes, el mayor amino terminal (α NTD) y el menor carboxilo terminal (α CTD). Para que la RNAP inicie la transcripción en un promotor particular, primero debe interactuar con una subunidad σ para formar la holoenzima. La subunidad σ asegura el reconocimiento de la secuencia promotora específica, ubica a la holoenzima RNAP en el promotor blanco y facilita la desnaturalización de la doble cadena del DNA cerca del sitio de inicio de la transcripción. Uno de los principales factores en *E. coli*, es σ^{70} , que habilita a la RNAP para reconocer a la mayoría de los promotores; otros seis tipos de subunidades σ sólo se necesitan durante ciertas fases de crecimiento o bajo condiciones específicas de estrés (Jishage *et al.* 2001; Browning y Busby, 2004). Se ha demostrado que algunas mutaciones en los residuos del extremo α CTD afectan las interacciones de la holoenzima con

algunas proteínas reguladoras (Hayward *et al.* 1991), mientras que otras mutaciones afectan su interacción con el DNA (Holcroft y Egan, 2000a).

Una proteína reguladora es aquella involucrada en controlar la expresión genética, por lo general se une a un sitio específico en el DNA, algunas veces localizado cerca del promotor, aunque no siempre. Los reguladores en *trans* que se unen a un sitio *cis* y encienden un gen se llaman activadores o si lo apagan se llaman represores. En los procariotes los represores se unen a regiones llamadas operadores, localizadas corriente abajo, respecto al sitio de inicio de la transcripción, cerca del promotor (Shaw, 2008). Cuando un factor de transcripción (TF) se une a un promotor, puede activar o reprimir el inicio de la transcripción. Algunos TFs funcionan únicamente como activadores o como represores, otros pueden funcionar según el promotor blanco. Los activadores mejoran la función de un promotor facilitando su afinidad por la RNAP. Es probable que la mayoría de los activadores funcionen por su unión al promotor blanco antes de actuar sobre la RNAP, alterando la conformación del DNA promotor (Lloyd *et al.* 2001; Browning y Busby, 2004). Un complejo grupo de interacciones entre genes, moléculas de RNA, proteínas (incluyendo TF) y otros componentes del sistema de expresión, determinan si un gen es transcrito o no.

Más de 100 factores de transcripción (TF) pueden modificar la expresión de genes específicos en *E. coli*, mediante contactos intermoleculares entre DNA y la(s) subunidades de la RNAP. Aparte de los factores dedicados a la transcripción, la mayoría presentes en poca cantidad, se encuentran abundantes proteínas de unión a DNA (IHF, Fis, H-NS, entre otras) que contribuyen a regular la transcripción, modificando la arquitectura de muchas regiones reguladoras, acercando tridimensionalmente las secuencias de DNA que de otra forma no podrían acercarse entre ellas (Vicente *et al.* 1999; Babu y Teichmann, 2003).

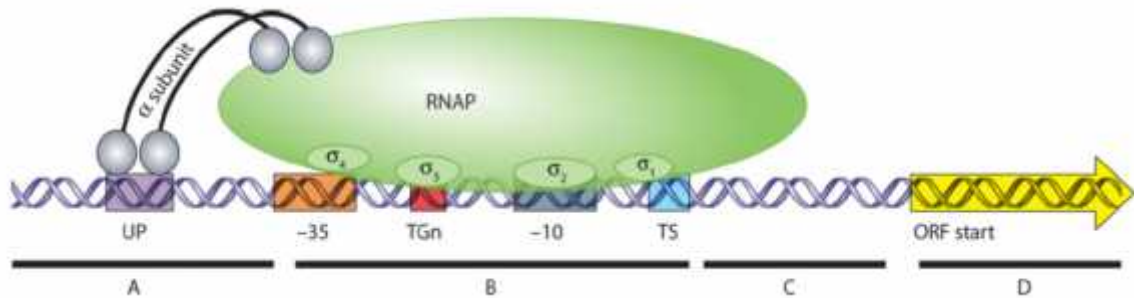
La transcripción consiste en cinco fases: i) Preiniciación, el *core* RNAP se une a los elementos centrales del promotor (-10 y -35; señalan la ubicación de

cada secuencia respecto al sitio de inicio de la transcripción) de un gen en el genoma; después de la unión de la RNAP se forma una burbuja de transcripción entre -10 y +2, mediante un proceso llamado isomerización (Browning y Busby, 2004). ii) Iniciación, los factores se asocian con la RNAP (holoenzima) y le permiten el reconocimiento de las secuencias -10 y -35. iii) Despeje del promotor, ocurre después de que la primera base de DNA es transcrita en mRNA, durante este proceso, la RNAP se desplaza del DNA, produciendo transcritos incompletos (iniciación abortiva), cuando se han formado aproximadamente 23 pb, la RNAP no se desplaza más del DNA. iv) Alargamiento, involucra la extensión del transcrito de mRNA hasta que se da la terminación. v) Terminación, está mediada ya sea por estructuras en horquilla en el DNA (terminadores transcripcionales; terminación independiente de Rho) o por la unión del cofactor Rho, que separa el mRNA del DNA (Ciampi, 2006; van Hijum *et al.* 2009). Este cofactor, puede ser influenciado favorablemente en su eficiencia, durante la terminación, por un factor suplementario como NusG, así como, por otros cofactores desconocidos (Banerjee *et al.* 2006).

Algunos genes se transcriben sumamente bien, mientras que otros apenas si son transcritos o no se transcriben, esto se debe a que la regulación transcripcional sucede principalmente durante la unión inicial de la RNAP al DNA, proceso de isomerización y durante el estado temprano del progreso de la RNAP a lo largo del $dsDNA$ (Browning y Busby, 2004). Debido a que el flujo de factores y de RNAP libre es limitado en una célula, hay una intensa competencia entre promotores por la unión de la holoenzima de la RNAP (Browning y Busby, 2004; van Hijum *et al.* 2009). La unión de una subunidad específica de la RNAP tiene un papel importante en la regulación transcripcional. Las tres funciones principales de los factores son (i) asegurar el reconocimiento de los elementos promotores base, (ii) ubicar a la RNAP en el promotor blanco y (iii) abrir el dúplex de DNA cerca del sitio de inicio de la transcripción (van Hijum *et al.* 2009) (Figura 3).

En los promotores que controlan la transcripción de los genes se han identificado cuatro elementos con diferentes secuencias: los hexámeros -10 y -35, la región extendida a -10 y la secuencia UP. La participación de cada elemento difiere entre los promotores estudiados (Figura 3) (Busby y Ebright, 1994; Browning y Busby, 2004).

Un genoma codifica diferentes factores σ y diferentes TF (más de 100 en *E. coli*) (Babu y Teichmann, 2003), cuya combinación citoplásmica, tiempo específica, determina la respuesta transcripcional de cada bacteria, guiando a la RNAP al grupo de genes blanco específicos (Gruber y Gross, 2003). En general, los factores σ constitutivos de las bacterias son similares al factor σ^{70} de 70 kDa de *E. coli* (Gruber y Gross, 2003) y regulan genes involucrados en el crecimiento celular (van Hijum *et al.* 2009). Diversos factores σ con frecuencia están regulados por factores anti- σ , que inhiben su función bajo condiciones específicas (van Hijum *et al.* 2009).



Tipo	Mecanismo	Acción	Unión del TF			
			Río arriba (A)	Núcleo del promotor (B)	Río abajo (C)	ORF (D)
Represión	Ocultamiento estérico	No unión de RNAP		+		
Represión	Control	No alargamiento			±	+
Represión	Formación de asa en DNA	No unión de RNAP	+		+	±
Represión	Regulación del activador	Evita unión de activador	±	±		
Activación	Clase I	Interacción con	+			
Activación	Clase II	Facilita unión factor	+			
Activación	Cambio conformacional DNA	Torsión de hélice DNA		+		
Activación	Regulación del represor	Evita unión del represor	±	±	±	±

Figura 3. Mecanismos moleculares de regulación transcripcional. Se presentan las principales características de los cuatro tipos de represión y los cuatro tipos de activación. +, el TF se une en este sitio. ±, hay múltiples lugares donde el TF se puede unir. TS, sitio de inicio de la transcripción.

TGn región extendida del elemento -10. UP, elemento UP. ORF, gen regulado por el promotor. Las regiones indicadas en el dibujo superior como A, B, C, D, son referidas en la tabla inferior en las columnas correspondientes a la unión del TF. Dibujo tomado de van Hijum *et al.* 2009.

Los factores ⁷⁰ se unen al promotor en las secuencias -35 y -10, estas son secuencias relativamente conservadas de hexanucleótidos con las secuencias consenso TTGACA en la posición -35 y TATAAT en la posición -10 (Browning y Busby, 2004; van Hijum *et al.* 2009). La fuerza intrínseca del núcleo de un promotor es el resultado de la tasa de transcripción debida a los eventos de unión de factores de la transcripción que no pertenecen a la RNAP y, al grado con el que las secuencias de los elementos centrales del promotor igualan a las secuencias consenso.

Otros dos sitios importantes son la región extendida a -10 y el elemento UP (Figura 3). La región extendida a -10 se localiza corriente arriba de la secuencia -10 y está formada por cuatro nucleótidos con la secuencia consenso TRTG (Voskuil y Chambliss, 2002) y el elemento UP de aproximadamente 20 pb se localiza corriente arriba de -35 hasta -80 nucleótidos de distancia (van Hijum *et al.* 2009). Tales elementos UP se identifican fácilmente porque son ricos en AT y parecen estar asociados con promotores fuertes; su contribución a la unión de la RNAP difiere entre promotores, pudiendo resultar en una unión tan fuerte que impida que la RNAP escape de su promotor (van Hijum *et al.* 2009).

Las bacterias reaccionan a diferentes condiciones ambientales empleando diversos modos de regulación, e. g., metabólica, traduccional y transcripcional. Sus genes están organizados en una red jerárquica de regulones interconectados, que está organizada de manera flexible de acuerdo con las condiciones ambientales que enfrenta la célula. La expresión de los regulones está controlada por TFs con sus concomitantes blancos de unión a DNA, conocidos como sitios de unión a TF (TFBSs, por sus siglas en inglés) (van Hijum *et al.* 2009). Los TFBSs para un TF específico difieren en la secuencia de nucleótidos y la composición,

pero pueden representarse por un motivo de secuencia consenso de DNA. La ubicación y la composición de nucleótidos de los TFBSs establecen si un TF reprime o activa la expresión de un gen. La longitud de los TFBSs es entre 12 y 30 pb, pueden parecer repetidos directos o palíndromos que facilitan la unión en dímeros de TF (Rodionov, 2007). La mayoría de TF bacterianos tienen un dominio hélice-vuelta-hélice (HTH) y actúan como homodímeros. Los TFBSs pueden ubicarse en diferentes posiciones con respecto a las secuencias promotoras -35 y -10, pudiendo ser desde muy lejos corriente arriba, hasta corriente abajo del promotor (van Hijum *et al.* 2009).

El estado termodinámico de las proteínas TF se describe como un modelo de tres etapas (Lässig, 2007): (i) en difusión libre, como monómeros en tres dimensiones, (ii) unidos inespecíficamente al DNA, como mono u oligómeros, por medio de interacciones electrostáticas y después esparciéndose a lo largo del eje del DNA en una dimensión y, (iii) unido específicamente a un sitio de unión, en un estado de mínima energía local por medio de enlaces de hidrógeno, así como por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. El cambio entre los últimos dos estadios involucra un cambio de conformación del TF, disparado por el reconocimiento molecular de un mínimo de energía, por medio de la unión de una proteína -hélice a la curva mayor del DNA. La combinación de estos tres estados permite al TF encontrar su sitio blanco y unirse en relativamente poco tiempo (Lässig, 2007; van Hijum *et al.* 2009).

Algunos TF reprimen y otros activan la transcripción y otros más activan y reprimen, según la posición del TFBS en relación con el sitio de unión del factor en un promotor blanco (Pérez-Rueda y Collado-Vides, 2000). La unión y liberación del represor y del activador está controlada por la unión de cofactores, que son moléculas que varían en tamaño y naturaleza, desde pequeños iones y nucleótidos, hasta restos de fosfatos y azúcares unidos covalentemente a péptidos o a proteínas completas (van Hijum *et al.* 2009). Aunque la mayoría de activadores se unen primero al promotor en el DNA antes de interactuar con la RNAP, algunos

activadores (como MarA y SoxS en *E. coli*) también se unen a la RNAP libre en el citosol previo a la unión a sus TFBSs (Griffith y Wolf, 2004; Martin *et al.* 2002).

Hay cuatro formas principales como los TF intervienen en la represión (van Hijum *et al.* 2009) (Figura 3): (i) represión por ocultamiento estérico, unión del represor entre o sobre los elementos centrales del promotor; (ii) represión por bloqueo del alargamiento de la transcripción, unión en el inicio de la región codificante (mecanismo “roadblock”); (iii) represión por formación de asas en el DNA, con sitios de unión corriente arriba y corriente abajo del promotor y; (iv) represión por regulación de un activador, el represor se une a un TFBS que (parcialmente) se traslapa con un TFBS de un activador.

También se han descrito cuatro formas de activación por los TF (Browning y Busby, 2004; van Hijum *et al.* 2009) (Figura 3): (i) activación clase I, el TF se une corriente arriba del promotor e interactúa con la subunidad σ de la RNAP; (ii) activación clase II, el TF se une en forma adyacente (corriente arriba) al promotor y promueve la unión del factor σ ; (iii) activación con un cambio de conformación en el DNA, el TF se une al promotor y permite que se le una el factor σ , con frecuencia por el enrollamiento del DNA y; (iv) activación por regulación, eliminando el efecto represor (antirrepresión).

Un aspecto importante en el mecanismo de transcripción es la interacción de activadores y represores con la RNAP, mediada por el promotor. Las proteínas activadoras y represoras pueden afectar cualquier evento del inicio de la transcripción. Así, hay dos mecanismos principales mediante los cuales las proteínas pueden activar el inicio de la formación del transcrito en un promotor: el de las proteínas activadoras que interactúan directamente con la RNAP en el promotor blanco y, el de los activadores que alteran la conformación del promotor para mejorar su reconocimiento por la RNAP. Los activadores de interacción directa con la RNAP, pueden ser de clase I, si se unen en regiones corriente arriba cerca de las posiciones -61, -71, -81 ó -91 y funcionan por interacción directa con

CTD, estabilizando el complejo cerrado RNAP-promotor y, de clase II si se unen en un sitio que se superpone a la región -35 del promotor blanco, interactuando con σ , CTD o NTD de la RNAP (Busby y Ebright, 1997; Hochschild y Dove, 1998; Dove *et al.* 2003).

Algunos activadores bacterianos de la transcripción tales como CRP (proteína receptora de cAMP), FNR y AraC, se unen en sitios del DNA que se sobreponen a la secuencia -35 del promotor blanco e interactúan directamente con la holoenzima RNAP, específicamente con el dominio o región 4 de la subunidad σ^{70} , especialmente en la secuencia comprendida entre los residuos aminoacídicos 590 a 603 (Lonetto *et al.* 1998). Al parecer, la función de los activadores es reunir a la RNAP con el promotor y además acelerar la transición del complejo cerrado al complejo abierto, como ocurre en la interacción del residuo D261 de MelR con los residuos R599 y R596 del dominio 4 de la subunidad σ de la RNAP durante la activación del promotor *melAB* de *E. coli* (Grainger *et al.* 2004a).

Aunque la unión a DNA se ha caracterizado para diferentes miembros de la familia de reguladores AraC/XylS, la activación de la transcripción y su interacción con las subunidades σ y/o σ^{70} de la RNAP por esta familia de proteínas no está bien definida. Se ha demostrado que la activación de varios promotores dependientes de esta familia de activadores necesita del dominio CTD de la RNAP. Existe fuerte evidencia de interacción entre CTD y las proteínas MarA, SoxS y Rob, en estos casos los activadores se unen al DNA corriente arriba pero no se sobreponen a la región -35 del promotor; en el caso de un promotor *rhaBAD* truncado, con RhaS como único activador, la supresión de CTD causa una disminución de 180 veces en la activación de la transcripción y, se han identificado ocho sustituciones de residuos de alanina en CTD como candidatos para hacer contacto con RhaS (Bhende y Egan, 2000).

El promotor clase I mejor caracterizado es el promotor *lac*, este tiene un sitio de unión para CAP [“catabolite activator protein”, proteína activadora de

catabolitos también conocida como proteína receptora de cAMP (CRP)] centrado en la posición -61.5; la activación requiere del dominio CTD, en el que se han identificado, por medio de sustituciones de aminoácidos únicos, tres determinantes críticos (265, 261 y 287, cada uno nombrado por la posición en la cual las sustituciones dan como resultado los defectos más graves) para la interacción (Busby y Ebright, 1999).

Los residuos de los tres determinantes críticos de CTD de la RNAP, identificados para la interacción con los activadores son: determinante 265 (R265, N268, N294, G296, K298, S299 y E302) para interacción CTD-DNA, en promotores dependientes de CRP tipo I y II; determinante 261 (V257, D258, D259 y E261) probablemente para interacción con de la RNAP en promotores tipo I y; determinante 287 (T285, E286, V287, E288, L289, G315, R317 y L318) para interactuar con CRP en promotores tipo I y II (Savery *et al.* 2002).

La proteína CRP de *E. coli* activa el inicio de la transcripción de más de 100 diferentes promotores, su función es unirse en sitios específicos en el DNA o cerca del promotor blanco y aumentar la capacidad de unión y de inicio de la transcripción de la RNAP. Los promotores que dependen de CRP para activación de la transcripción se agrupan en dos clases: Clase I, el sitio de unión de CRP se localiza corriente arriba del sitio de unión de la RNAP y Clase II, el sitio de unión de CRP se ubica cerca de la posición -42 y por lo tanto se sobrepone con el sitio de unión de la RNAP en -35. El mecanismo de transcripción en promotores clase II involucra dos componentes: anti-inhibición de CTD y activación directa de NTD (Busby y Ebright, 1997).

Johnson y Schleif (2000) y Belyaeva *et al.* (2000) demostraron que las proteínas de la familia AraC/XylS, activan promotores de clase II. En estos casos AraC activa la expresión del operón *araBAD*; RhaS de *rhaBAD* y *rhaT*; MelR de *melAB* y de *melR* y, XylS de Pm; en la mayoría de estas proteínas, CRP también interactúa con los promotores blanco (Busby y Ebright, 1999; Belyaeva *et al.*

2000). Las proteínas MarA, Rob y SoxS activan las dos clases de promotores, aunque la activación de promotores clase I requiere del dominio CTD de la RNAP y la de los promotores clase II es independiente de este dominio.

Prácticamente todos los miembros de la familia AraC/XylS son capaces de activar la transcripción por diferentes mecanismos, algunos requieren de la subunidad CTD (e.g. AraC, XylS, SoxS, MarA, MelR y Rob), habiendo reconocido en algunos la forma de interacción, por ejemplo entre el activador de clase II MelR y los residuos E273, V287, E288 y L289 de CTD o entre XylS y los residuos 137 y 153 del dominio CTD (Holcroft y Egan, 2000a y 2000b; Grainger *et al.* 2004b); otros del extremo carboxilo terminal de la subunidad (RhaS y MelR); unos son capaces de activar la transcripción de promotores clase II en ausencia de estas subunidades; lo que si es claro, es que el dominio NTD no es blanco de activación en esta familia de activadores (Gourse *et al.* 2000; Egan *et al.* 2000).

Algunos estudios han proporcionado evidencia de las interacciones proteína-proteína entre activadores y RNAP, éstas participan en el proceso total de activación de la transcripción, como ocurre entre RhaS y la región 4 de la subunidad ⁷⁰ de RNAP a través de los residuos de aminoácidos D250 y K593, respectivamente (Wickstrum y Egan, 2004). Un mecanismo de regulación reportado es la activación ambidiestra, como es el caso de SoxS (proteína que estimula la transcripción *in vitro* de un regulón de respuesta a estrés oxidativo), que correlaciona perfectamente la ubicación de una secuencia llamada “soxbox” con respecto al hexámero -35 del promotor y la dependencia de la activación en el dominio CTD. SoxS puede interactuar con diferentes dominios o subunidades de la RNAP, siendo un activador de clase I cuando activa dos de los genes del regulón, *zwf* y *fpr*, y un activador clase II cuando activa los otros genes del regulón, *fumC*, *micF*, *nfo* y *soda*. Esto es SoxS utiliza CTD en algunos promotores, pero no en otros (Jair *et al.* 1996). Otro activador ambidiestro es MarA, activador transcripcional de más de una docena de genes del regulón *mar* de *E. coli*, los cuales están involucrados en resistencia a los antibióticos. En

algunos casos funciona como activador de clase I, al interactuar corriente arriba del hexámero -35 de los promotores *fpr* y *swf*, y de clase II sobrepuesto al hexámero -35 de los promotores *inaA*, *fumC* y *micF* (Jair *et al.* 1995; Martin *et al.* 1999; Egan *et al.* 2000).

Otro mecanismo de interacción es por medio de unión cooperativa entre el regulador y la subunidad σ de la RNAP, como es la interacción débil pero necesaria sobre el DNA entre AraC, que ocupa sólo dos bases de la región -35 y sigma, que no lee el DNA de la región -35, a diferencia de lo que ocurre entre XylS y la RNAP, en que ambos se sobreponen a la región -35 facilitando la interacción entre ambas proteínas (Dhiman y Schleif, 2000; González-Pérez *et al.* 2002).

IV. REGULADORES TRANSCRIPCIONALES

AraC/XylS

La regulación de la transcripción en bacterias involucra proteínas que pueden activar o reprimir a los promotores correspondientes. Un grupo de tales proteínas es la familia AraC/XylS, se caracteriza por tener un dominio amino terminal no conservado con una función probable de reconocimiento de ligando y relacionada con procesos de dimerización y detección de señales químicas, un segmento carboxilo terminal altamente conservado de 99 residuos de aminoácidos, que está involucrado en la unión a DNA, el cual representa la secuencia consenso para la familia por la presencia de 17 residuos altamente conservados

(**AxxxxxSxxxLxxxFxxxxGxxxxxxxxxxxxRxxxAxxxLxxxxxxxx(I/V)xx(I/V)xxxxG(F/Y)xxx
xxFxxxF(R/K)xxxGxxP**), donde x es cualquier aminoácido. Esta región carboxilo posee un posible dominio de contacto a la RNA polimerasa (RNAP) y dos potenciales motivos de unión a DNA, con una estructura secundaria tipo HTH (- helix-turn- -helix). Por la divergencia en sus secuencias, el motivo HTH1 probablemente es el responsable del reconocimiento de las secuencias blanco en los promotores y el motivo HTH2, altamente conservado, tal vez represente funciones comunes a todos los miembros de la familia, como podría ser el reconocimiento con la maquinaria de transcripción; finalmente, un conector está presente en la estructura de estas proteínas, cuya función es unir los dominios amino y carboxilo (Figura 4) (Gallegos *et al.* 1997; Manzanera *et al.* 2000).

La mayoría de las proteínas de la familia AraC/XylS son activadores transcripcionales positivos que regulan funciones como (i) metabolismo de carbono (utilización de azúcares), estimulando la transcripción del promotor respectivo en respuesta a la presencia del efector, por ejemplo: AraC, RhaS y XylS; (ii) respuesta a estrés, requieren de ser producidas en exceso para ejercer

su efecto regulador, por ejemplo: MarA, Rob y SoxS, estas proteínas son monómeros con elevada homología entre ellas y manifiesta regulación cruzada de ciertos genes y; (iii) virulencia, regulan la expresión en respuesta a señales físicas como temperatura, además de estar involucrados en la producción y regulación de factores de virulencia. Esta familia de activadores puede autorregularse y controlar genes únicos, operones y regulones formando redes reguladoras complejas con otros reguladores (Gallegos *et al.* 1997; Manzanera *et al.* 2000). Se han estudiado algunos miembros de esta familia con el propósito de conocer las regiones que son esenciales para la función de la proteína (Tabla 2).

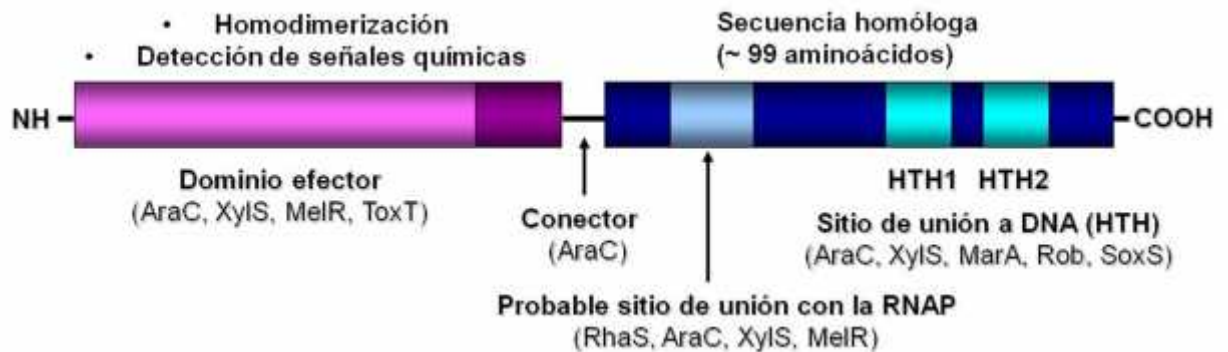


Figura 4. Características estructurales de la familia AraC/XylS. Dibujo modificado de Lara-Ochoa, 2004.

A. REGULADORES (TF) AraC/XylS INVOLUCRADOS EN LA UTILIZACIÓN DE AZÚCARES. Las proteínas AraC (L-arabinosa), RhaS (L-ramnosa) y MelR (melibiosa) se unen a su DNA blanco en forma de dímero a través del dominio HTH2, como respuesta a la unión de los azúcares efectores (Bustos y Schleif, 1993; Gallegos *et al.* 1997; Bhende y Egan, 1999; Wade *et al.* 2000; Harmer *et al.* 2001; Grainger *et al.* 2003).

AraC. Regula el operón de L-arabinosa en *Escherichia coli*, contiene dos dominios, el amino terminal proporciona la capacidad de formar dímeros y une al ligando de arabinosa, y el dominio carboxilo terminal tiene capacidad de unión al DNA y de activar la transcripción, ambos dominios se encuentran conectados por un brazo flexible y aumentan la sensibilidad de AraC por la arabinosa. AraC es un dímero tanto en presencia como en ausencia de arabinosa. En ausencia de arabinosa AraC reprime la expresión debido a que un monómero de AraC ocupa el sitio *araI*₁ y el otro se ubica en el sitio *araO*₂. El dímero unido en esta forma genera una curvatura en el DNA que evita la transcripción de los promotores *araBAD* (catabolismo de arabinosa) y *araC* (control de la expresión y autorregulación) al bloquear el acceso a la RNAP (Figura 5). En presencia de arabinosa, AraC activa la transcripción de los operones catabólicos mencionados a través de un cambio de conformación al ubicarse en sitios adyacentes *araI*₁ y *araI*₂, este último sitio se sobrepone a la región -35 del promotor, secuencia de reconocimiento por la RNAP, con quien se ha identificado una débil interacción con los residuos K593 y R596, por lo que se le considera un regulador transcripcional de clase II. Aunque el brazo amino terminal no es esencial para activar la transcripción si participa en mantener el sistema en estado no activo en ausencia de arabinosa uniéndose al dominio carboxilo terminal formando un asa, cuando se une la arabinosa se abre y se activa la transcripción (Saviola *et al.* 1998b; Ross *et al.* 2003; Schleif, 2003). Sin embargo, Weldon y Schleif observaron, ante el comportamiento de mutantes en este dominio amino terminal, que este brazo se mantiene unido al dominio de dimerización aún en ausencia de arabinosa interfiriendo con la interacción proteína-proteína (Saviola *et al.* 1998a; Saviola *et al.* 1998b; Reed y Schleif, 1999; Dhiman y Schleif, 2000; Harmer *et al.* 2001; Ross *et al.* 2003; Schleif, 2003; Weldon y Schleif, 2006; Lee *et al.* 2007). Rodgers y Schleif desarrollaron un modelo para medir la distancia entre AraC y su sitio de unión a DNA, observaron que las posiciones y orientaciones de los dominios de unión de AraC, en ausencia de arabinosa, no se ubican de forma plana sobre su sitio promotor, sino que se

encuentran inclinados en 90° uno de otro, lo que facilita la formación del asa del DNA superenrollado (Figura 5) (Rodgers y Schleif, 2008).

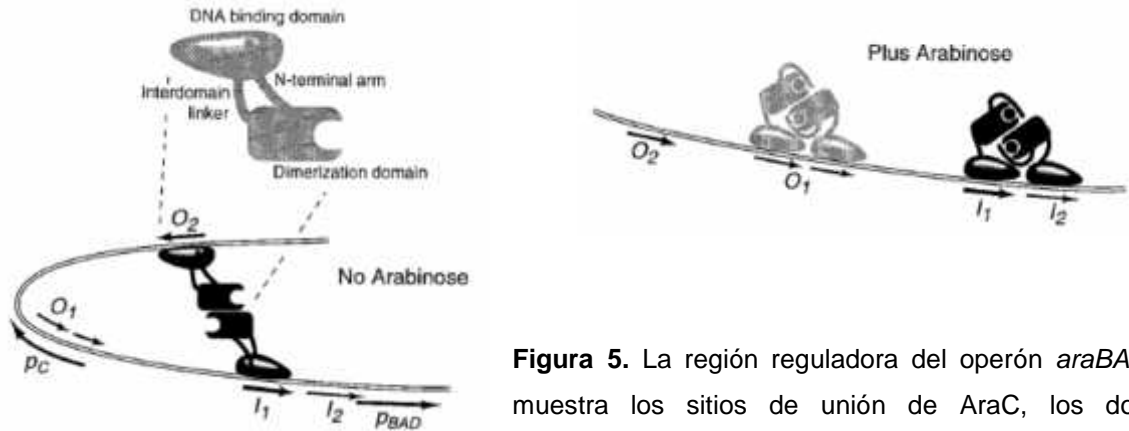


Figura 5. La región reguladora del operón *araBAD* muestra los sitios de unión de AraC, los dos promotores (P_{BAD} y P_C), y el mecanismo de cambio cuando se encuentra activa. AraC se une al sitio $O1$ en presencia de arabinosa. Tomado de Harmer *et al.* 2001.

B. REGULADORES (TF) DE LA FAMILIA AraC/XylS RELACIONADOS CON LA RESPUESTA A ESTRÉS. Las proteínas MarA (resistencia a los antibióticos) y SoxS (respuesta a estrés oxidativo) se unen como monómeros a secuencias asimétricas de 20 pb, llamadas “*marbox*” y “*soxbox*”, respectivamente. Esto puede ser a través de los dos dominios HTH de la región carboxilo terminal, que hacen contacto con segmentos adyacentes del surco mayor del DNA (Li y Demple, 1994; Rhee *et al.* 1998; Martin *et al.* 1999; Wood *et al.* 1999; Griffith y Wolf Jr., 2002).

SoxS. En *E. coli* es el activador transcripcional directo de por lo menos 16 genes miembros del regulón superóxido, *soxRS*, (*acnA*, *acrAB*, *fldA*, *fpr*, *fumC*, *inaA*, *mar*, *micF*, *nfo*, *nfsA*, *poxB*, *pqi5*, *ribA*, *sodA*, *tolC* y *zwf*), que le confiere tolerancia a solventes orgánicos, resistencia a diversos antibióticos y metales pesados y combate el estrés oxidativo impuesto por compuestos del ciclo redox.

La inducción del regulón *soxRS* se presenta en dos pasos: 1) una señal intracelular de estrés oxidativo convierte a la proteína SoxR, expresada constitutivamente en un activador transcripcional del gen *soxS*. 2) Sobreproducción de SoxS que activa la transcripción de los genes blanco del regulón.

En vista de que SoxS carece del dominio de dimerización que poseen otros miembros de la familia AraC/XylS, es probable que se una al DNA como monómero, de ser así, un dominio proximal al promotor blanco puede hacer contacto con la subunidad alfa de la RNAP en un sitio corriente arriba de la región -35, con orientación reversa, a excepción de *zwf*, comportándose con un activador de clase I (*acrAB*, *fldA*, *fpr*, *mar*, *poxB*, *ribA*, *zwf*). Mientras que un dominio distal al promotor que se sobrepone a la región -35, pudiera hacer contacto con alguna otra subunidad de la RNAP (*fumC*, *inaA*, *micF*, *nfo*, *pqi5*, *sodA*) (Martin *et al.* 2002). Estas posiciones y orientaciones indican que SoxS es un activador transcripcional ambidiestro que necesita de diferentes interacciones proteína-proteína entre el activador y la RNAP (Jair *et al.* 1996; Wood *et al.* 1999; Griffith y Wolf, 2001; 2002; 2004).

C. REGULADORES (TF) DE LA FAMILIA AraC/XylS INVOLUCRADAS EN LA PRODUCCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA. Se han encontrado en microorganismos que colonizan el sistema gastrointestinal, como: Rns de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), VirF de *Shigella flexneri*, ToxT de *Vibrio cholerae* y PerA de EPEC. Estas proteínas están involucradas en la síntesis de proteínas que participan en la adherencia. No se sabe exactamente si este grupo de proteínas actúa como monómeros o dímeros.

ToxT. En respuesta a condiciones ambientales específicas como temperatura, pH y osmolaridad, *V. cholerae* expresa determinantes de virulencia

como la toxina del cólera (CTX), el pilus corregulado por toxina (TCP), los factores de colonización accesorios y una proteína principal de membrana externa (OmpU) (Medrano *et al.* 1999). ToxT es una proteína de 32 kDa que funciona como dímero. El extremo amino terminal está involucrado en la detección de señales ambientales y al parecer contiene los motivos necesarios para activar la transcripción, su extremo carboxilo terminal participa en la unión a DNA (Prouty *et al.* 2005). La cascada de regulación involucra dos proteínas activadoras ToxR y TcpP, que a su vez activan la transcripción de *toxT*. ToxT activa la expresión de otros genes de virulencia, incluyendo *ctxAB* y *tcpA-F*. TcpP es indispensable para la transcripción de *toxT* y la consiguiente expresión de CTX y TCP, mientras que TcpH sólo se necesita para la producción y mantenimiento de los niveles silvestres de la transcripción de *toxT* sin ser necesaria para activar la transcripción (Yu y DiRita, 1999; Krukoniš *et al.* 2000).

La activación de la transcripción de *tcpA* depende de la activación de *toxT* por ToxR. Para que el promotor *ctxAB* se active, es importante que ToxT se produzca, sin importar que ToxR por si sólo lo pueda activar (Krukoniš *et al.* 2000).

toxT se localiza corriente abajo de *tcpF* dentro del grupo génico que codifica para TCP, en la isla de patogenicidad de *V. cholerae*, su activación se autorregula. La activación de *toxT* por ToxR y TcpP, induce la formación de un asa autoreguladora, en la que la transcripción dependiente de ToxT, desde el promotor *tcpA*, lee a través de un terminador entre *tcpF* y *toxT*, lo que resulta en la producción continua de ToxT. No hay homología entre las secuencias promotoras de *ctx* y *tcp*, más allá del hecho de que ambas son ricas en AT. La región promotora *ctx* contiene de 3 a 8 repetidos directos en conjunto de la secuencia TTTTGAT, un mínimo de 3 repetidos de esta secuencia se necesitan para la activación dependiente de ToxT del promotor *ctx*. Los sitios de unión con alta afinidad que se han identificado están de -111 a -41 y, con baja afinidad de -118 a -112 y de -40 a -13. Probablemente ToxT estimula una máxima activación mediante la interacción con la RNAP (Yu y DiRita, 1999, 2002).

La región de -85 a -41, en el promotor *tcpA* contiene elementos que son responsables de la activación dependiente de ToxT. Probablemente son dos sitios de unión para ToxT con diferente afinidad: los sitios corriente arriba presentan mayor afinidad y los sitios corriente abajo, cerca del promotor basal, son de baja afinidad. La unión de ToxT en estos sitios denominados “*toxbox*” se da en una configuración repetida (Withey y DiRita, 2006).

Se ha observado que ToxT durante la activación de *tcpA* interactúa con dos regiones ricas en adenina centradas en los sitios -72 y -51, que necesita de la subunidad CTD de la RNAP, aunque aún no se determinan los residuos de interacción, como se une corriente arriba del sitio -35 entonces ToxT actuaría como un regulador de clase I (Hulbert y Taylor, 2002). Por medio de mutagénesis sitio dirigida con residuos de alanina, se ha probado que 17 residuos del dominio amino terminal aumentan considerablemente la actividad transcripcional de los promotores *ctxA* y *acfA*, y 20 residuos la disminuyen hasta en un 90%. Por el contrario, en cuanto al dominio carboxilo terminal, solamente el residuo T183 es capaz de aumentar por más de 300% la actividad transcripcional del promotor *ctxA* y 30 residuos disminuyen la actividad de ambos promotores hasta en un 90%. En cuanto a la capacidad de activar la expresión de los factores de virulencia CT y TCP, 22 residuos (10 en el dominio amino terminal y 12 en el carboxilo terminal) son esenciales para la función de ToxT durante la expresión de ambos factores. En cambio los residuos W34 y S257 sólo participan en la expresión de CT y los residuos E52, E129, S175, E233 y T253 en la expresión de TCP. Se observó que el residuo F151 participa en el fenómeno de dimerización. Respecto a los residuos involucrados en la unión a DNA, se presentó de forma preliminar, que el motivo HTH2 contiene residuos de importancia en la unión a los sitios promotores *ctxA*, *tcpA* y *acfA*. Esto demuestra la participación de aminoácidos específicos de ToxT en la activación transcripcional, la dimerización y la unión a DNA (Childers *et al.* 2007).

PerA. Proteína de 274 aminoácidos (31.8 kDa); activador del operón *bfp*, también participa en la expresión de otros determinantes de virulencia localizados en la isla de patogenicidad LEE. PerA se une presuntamente como monómero y activa positivamente a los promotores *bfpA* (P_{bfpA}) y *perA* (P_{perA}); sus dominios HTH1 y HTH2, están involucrados en el reconocimiento de la secuencia de unión a DNA de las regiones reguladoras de los genes *per* y *bfp*. PerA autorregula positivamente su expresión; que también, es regulada negativamente por H-NS y lo contrarresta sobre P_{bfpA} y P_{perA} (Tobe *et al.* 1996; Bustamante *et al.* 1998; Martínez-Laguna *et al.* 1999; Mellies *et al.* 1999; Ibarra *et al.* 2003; Porter *et al.* 2004). Sin embargo, la participación de PerA en el mecanismo de regulación de los genes de virulencia en EPEC no se conoce por completo.

Tabla 2. Características y fenotipos de mutaciones en proteínas de la familia AraC/XylS.

REGULADOR	MUTACIONES/REMOCIONES ^a	FENOTIPO	REFERENCIA
AraC	L9K ¹ , N16D ¹ , T241E ¹ , L237C ¹ , L238Q ¹ , L239T ²	Activación constitutiva	Wu y Schleif, 2001a y 2001b
	D256A ²	Sin actividad	Niland <i>et al.</i> 1996
	L260A ¹ , L264A ¹ , K257A ¹ , S258A ¹ , D261A ¹ , T265A ¹ , N222A ¹ , S271A ¹ , R273A ¹	Sin actividad	Grainger <i>et al.</i> 2003 y 2004a
MelR	D256A ¹	Actividad similar a silvestre	
	Q229A ¹ , R230A ¹ , S276A ¹	Activación constitutiva	
	R202A ¹ , R206A ¹		Bhende y Egan, 1999 y 2000
RhaS	D241A ²	Actividad residual	Wickstrum y Egan, 2004
	D250A ²		
	N8 ¹ , N39 ¹	Actividad residual	
XylS	N209 ¹	Activación constitutiva	Kaldalu <i>et al.</i> 2000
	P309EVH ² , I282E ² , G290A ² , F297Y ² , Y301V ¹	Sin actividad	
	H3A ¹ , K5A ¹ , D9A ¹ , K30A ¹ , S31A ¹ , V45A ¹	Sin actividad P _{I y II}	Griffith y Wolf, 2002
SoxS	D75A ¹ , F74A ¹ , M78A ¹ , D79A ¹ , Q85A ¹	Sin actividad P _{II}	
	Y23S ³ , V191A ³ , V228T ³ , Y239F ²	Sin actividad	Porter y Dorman, 2002
VirF	L72F ³ , A154T ¹ , E196K ³ , S236N ²	Actividad residual	
	T138A ¹	Sin efecto	
PerA	K249M ² -Y255A ² , Y255A ²		Grupo Puente (IBT- UNAM)
	P259A ² , K260Ocre ¹ ,		
	S194A ³ , R199G ³	Sin actividad	Grupo Martínez-Laguna (CICM-ICUAP)
	I232A ³ -L238F ³		
	30-49 ¹		
	Q40R ¹ -F41I ¹	Actividad residual	
	S162R ¹	Actividad aumentada	
	Y26F ³	Actividad constitutiva	
	K200I ² , E234A ³ -S236C ² , Y246F ²	Sin actividad	Porter <i>et al.</i> 2004
	E234A ³	Actividad parcial	
	Y26A ³	No efecto	Grupo Puente (IBT- UNAM)
Y29A ¹ , Q40R ⁴	Sin actividad		
K14A ³	Actividad residual	Grupo Martínez-Laguna (CICM-ICUAP)	
Q40R ¹ -F41I ¹	Actividad disminuida		

a: conservación del residuo dentro de la familia AraC/XylS, 1: no conservado, 2: altamente conservado, 3: conservado entre reguladores de virulencia, 4: sin regulación por temperatura; P_{I y II}: promotores clase I y clase II; : supresión

Grupos Puente y Martínez-Laguna.

V. ANTECEDENTES

En EPEC no se conoce completamente el modelo de regulación en el momento del inicio de la transcripción de los operones *bfp* y *per*, esto es, durante la formación del complejo entre la RNAP, el promotor (*bfp* o *per*) y la proteína activadora (PerA). La información obtenida hasta el momento, ha revelado que PerA actúa como monómero al activar la transcripción de los promotores *perA* y *bfpA*, que las secuencias necesarias para la unión de PerA en las regiones reguladoras de éstos, comparten 71% de identidad y se ubican en las posiciones entre -75 y -47 en *per* y entre -85 y -46 en *bfp* (Bustamante *et al.* 1998; Ibarra *et al.* 2003).

Esto sugiere que los residuos de interacción con el promotor son sitio específicos, de tal forma que favorecen el contacto en los surcos mayores del DNA o bien, inducen un cambio de configuración de PerA, que a la vez requiere de cierta región, para desarrollar su papel de activador adecuadamente.

En nuestro grupo de investigación se han realizado diferentes estudios, encaminados a caracterizar el extremo carboxilo terminal de la proteína PerA (Tabla 2). Estos incluyen el análisis de mutantes en PerA en torno a su capacidad de activar a los promotores de *bfpA* y de *perA*, o de interactuar con el DNA. Dichos estudios han mostrado que los dominios HTH-1 y HTH-2 están involucrados en el reconocimiento de la secuencia de unión a DNA de las regiones reguladoras de los genes *per* y *bfp* (Martínez- Laguna *et al.* datos no publicados). Datos adicionales sugieren que el dominio amino terminal es importante para conservar la capacidad de interactuar con el promotor y de activar la transcripción de *bfpA*, ya que mutantes de PerA con remociones de 20 residuos entre las posiciones 30 y 49, o con sustituciones en los residuos Q40R-F41I son incapaces de activar la

transcripción y de unirse a la secuencia reguladora (Tabla 2) (Martínez-Laguna *et al.* datos no publicados).

Porter y colaboradores determinaron que PerA también se requiere para la activación del regulador maestro del operón LEE, *LEE1*, pero su activación es indirecta, por medio de la autoactivación del promotor *per* que asegura la suficiente producción de la proteína PerC para activar a LEE1 (Bustamante *et al.* 2001; Porter *et al.* 2004).

Además, realizaron un análisis de diferentes mutantes en PerA en relación con su capacidad de activación del promotor blanco, de las mutantes examinadas sólo G37W, L94P, K200I, A221T y Y46F perdieron la capacidad de activación de ambos promotores *perA-lacZ* y *bfpA-lacZ*, sin embargo, encontraron que las mutantes en PerA D100A y D168A presentan un fenotipo de activación completa, y que la mutante en PerA E234A muestra actividad parcial de *perA*; aunque los autores reportan una incapacidad de las fusiones MBP-PerA para unirse al DNA blanco (Porter *et al.* 2004).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PerA es un regulador transcripcional que tiene un papel crítico en la regulación de la expresión de genes de virulencia en EPEC, porque está involucrado en el control de su propio operón, *perABC*, en la regulación de la expresión coordinada del operón *bfp*, así como de otros determinantes de virulencia localizados en la isla de patogenicidad LEE, a través de *perC*.

Se han caracterizado algunas proteínas de la familia AraC/XylS como activadores transcripcionales positivos que regulan funciones como metabolismo de carbono, respuesta a estrés y virulencia. PerA es una proteína que pertenece a

esta familia y está involucrada en la producción de los Bfp, que participan en la adherencia localizada de la bacteria a la membrana de la célula epitelial durante la patogénesis de la infección por EPEC (lesión A/E).

El proyecto se enfocó en buscar y determinar qué residuos del activador PerA son importantes para el reconocimiento de la región promotora durante la transcripción de los genes *bfpA* y *perA*, con el propósito de definir mejor los mecanismos involucrados en la regulación de los genes de virulencia dependientes de PerA. Haciendo una analogía con el mecanismo de regulación por parte de SoxS y de MarA, PerA podría ser un regulador ambidiestro, activando a los promotores: *perA* y *bfpA* a partir de dos posiciones distintas ya que las probables regiones de unión de la proteína PerA en ambos promotores están ubicadas a 11 nucleótidos, entre las posiciones -85 a -46, y a 7 nucleótidos, entre las posiciones -81 a -42, de los respectivos hexámeros -35 (Ibarra *et al.* 2003). Aunque aún no se ha establecido con que subunidades de la RNAP interactúa a nivel promotor, se propone que la activación de *perA* es de clase II y la activación de *bfpA* de clase I. El efecto autorregulador positivo se debe a la unión directa de PerA sobre el promotor de *perA* (Bustamante *et al.* 1998; Martínez-Laguna *et al.* 1999; Ibarra *et al.* 2003). Estos estudios aportarán conocimientos para entender mejor el mecanismo mediante el cual PerA regula la expresión de los factores de virulencia de EPEC en respuesta a señales ambientales y para buscar, la posible interacción de PerA con la RNAP.

VI. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

1. PerA contiene residuos aminoácidos que presentan un comportamiento diferencial durante la activación de los promotores blanco *bfpA* y *perA*.
2. PerA es un regulador transcripcional ambidiestro.
3. PerA es un regulador transcripcional de clase I.
4. PerA es un regulador transcripcional de clase III.
5. PerA es un regulador transcripcional que interactúa con la subunidad CTD o con la subunidad ⁷⁰ de la RNAP durante la activación de cualquiera de los promotores de los operones *bfp* y *per*.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la relación estructura-función de *perA* en la regulación de la expresión de los operones *bfp* y *per* en *epec*.

PARTICULARES

- A. Seleccionar mutantes PerA en aminoácidos presuntamente involucrados en la interacción con la RNAP.

- B.** Examinar el efecto de mutaciones bajo diferentes condiciones ambientales en la activación de *bfpA* y de *perA* dependiente de PerA.
- C.** Analizar el efecto de mutaciones en las subunidades σ^{70} de la RNAP en la activación de *bfpA* y de *perA* dependiente de PerA.

ESPECÍFICOS

- 1.** Generar y caracterizar mutantes puntuales en las porciones centrales de los dominios amino y carboxilo de PerA, presuntamente involucradas en el contacto con la RNAP.
- 2.** Analizar la expresión de *bfpA* y de *perA* en EPEC EAF⁻ bajo la regulación de PerA silvestre y de mutantes en condiciones de represión por temperatura y amonio.
- 3.** Analizar la expresión de *bfpA* y de *perA* en los bancos de mutantes de las subunidades σ^{70} de la RNAP en dominancia negativa en EPEC.
- 4.** Seleccionar mutantes de las subunidades σ^{70} de la RNAP que alteren la expresión de *bfpA* y de *perA* en EPEC.
- 5.** Predecir la estructura secundaria de PerA silvestre y mutantes.
- 6.** Generar un modelo del complejo de interacción entre PerA y la RNAP.

VII. METODOLOGÍA

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES EN PerA Y SU EFECTO SOBRE LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS OPERONES *bfp* Y *per*.

Con el fin de identificar qué aminoácidos específicos de PerA están involucrados en el posible contacto con la subunidades σ^{70} de la RNAP, se realizaron mutaciones puntuales a lo largo de la secuencia de PerA, incluyendo las regiones amino y carboxilo, reemplazando aminoácidos, con carga negativa, por alanina. Los residuos de aminoácidos que se sustituyeron por alanina, fueron: D100, D101, E116, D168 y E234.

La elección de dichos residuos se basó en el análisis del alineamiento entre las secuencias proteicas de PerA y otros miembros de la familia AraC/XylS, en el cual se ubicaron los residuos o regiones involucrados en la interacción de otros reguladores transcripcionales con las subunidades de la RNAP. Las sustituciones por alanina se realizaron por mutagénesis sitio dirigida mediante PCR inverso, diseñando oligonucleótidos que llevan cada una de las mutaciones indicadas. Los plásmidos portando los genes mutantes de *perA*, se secuenciaron para confirmar la presencia de cada mutación y asegurarse de que no se hayan dado cambios adicionales.

Estas mutantes se caracterizaron por su capacidad de activar la transcripción de las fusiones *perA-cat* y *bfpA-cat* en el fondo genético EPEC EAF⁻. Las mutantes afectadas en su capacidad de activación se fusionaron a la proteína de unión a maltosa (“Maltose Binding Protein”, MBP). Las proteínas fusionadas se

purificaron para analizar su unión a las regiones reguladoras de *perA* y de *bfpA* mediante ensayos de cambio en la movilidad electroforética.

Alternativamente, se realizó la predicción de la estructura secundaria de cada una de las mutantes en PerA en los siguientes programas informáticos: Jpred, PROF y PSIPRED (Ouali y King, 2000; Rost, 2001; Cole *et al.* 2008; Buchan *et al.* 2013).

EFECTO DE MUTACIONES EN PerA SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE *bfpA* Y *perA* BAJO DIFERENTES CONDICIONES AMBIENTALES.

Con base en resultados previos (Martínez-Laguna *et al.* 1999; Puente *et al.* 1996) en los que se estudió el efecto de la temperatura y del amonio en la expresión de *bfpA*, se investigó el efecto de la temperatura y del amonio no solo en la expresión de *bfpA*, sino también en la de *perA*. Para ello, se realizó el experimento con tres clonas de cada mutante en un fondo genético EPEC EAF⁻. Los ensayos se realizaron con cada uno de los plásmidos pK3 mut PerA (ver Tabla 3), mas pCAT201 (*bfpA-cat*) para evaluar la expresión de *bfpA* o, mas pUST166 (*perA-cat*) para ver la expresión de *perA*.

Los ensayos se realizaron (i) a 37°C, (ii) a 40°C y (iii) a 37°C más sulfato de amonio.

EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LAS SUBUNIDADES α Y σ^{70} DE LA RNAP SOBRE LA CAPACIDAD DE PerA PARA ACTIVAR LA EXPRESIÓN DE *bfpA* O DE *perA*.

Para estudiar las consecuencias de las mutaciones en las subunidades α y σ^{70} de la RNAP sobre la expresión de *bfpA* y de *perA*, se realizaron ensayos de

actividad de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT), con cada una de las cepas de *E. coli* mutantes en la subunidad β de la RNAP y con cada una de las mutantes en la subunidad β' de la RNAP, en presencia tanto de *bfpA* como de *perA*; para ello se tenía la construcción pAIG307 con la fusión transcripcional *bfpA-cat* bajo activación de *perA* silvestre, una colección de 69 mutantes en la subunidad β de la RNAP y una colección de 18 mutantes en la subunidad β' de la RNAP. Dado que no se tenía una construcción similar que tuviera la fusión transcripcional *perA-cat* bajo la activación de *perA* silvestre, se efectuó dicha construcción llamándola pYML-PerA. Se procedió a los ensayos de actividad CAT en el fondo genético EPEC EAF⁻, por un lado con el plásmido pAIG307 y por otro con el plásmido pYML-PerA. Enseguida se realizaron las transformaciones en dominancia negativa de cada una de las mutantes en sigma con ambos plásmidos y de cada una de las mutantes en alfa con ambos plásmidos también (ver Tabla 5).

Se realizó una selección de aquellas mutantes, tanto en β como en β' , que reducían considerablemente la expresión de *bfpA-cat* y de *perA-cat*. Sin embargo, algunas de las mutantes en RNAP presentaron problemas de crecimiento durante los ensayos Cat. Por lo anterior, se llevó a cabo, por una parte, hibridación tipo "slot-blot" (datos no mostrados) con el RNA de algunas de las mutantes en β y los oligonucleótidos iniciadores para la expresión de *bfpA* y de *perA* (ver Tabla 4). Por otra, RT-PCR, en fondo genético EPEC EAF⁺, con el RNA de otras de las mutantes en β e, iniciadores para expresión de *bfpA* y de *perA*. También se incluyeron oligonucleótidos para el gen del RNA 16S como control.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y plásmidos:

La siguiente tabla presenta las cepas bacterianas y los plásmidos, ya construidos y los que se realizaron en este estudio.

Tabla 3. Cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio

Cepa	Descripción	Referencia
E2348/69	EPEC silvestre O127:H6, NaI ^R	Levine <i>et al.</i> 1978
MC4100	<i>E. coli</i> K-12 cepa derivada en laboratorio	Casadaban, 1976
B171-10	EPEC, carece de pEAF derivada de B171-8.	Bustamante <i>et al.</i> 1998
BL21 (DE3)/pLysS	Cepa de expresión inducible con IPTG, T7 RNA polimerasa	Novagen
Plásmidos	Descripción	Referencia
pKK232-8	Proviene del pBR322 contiene el gen cloranfenicol acetiltransferasa (<i>cat</i>) sin promotor.	Brosius, 1984
pMPM-K3	Proviene del vector de clonación p15A, Km ^R .	Mayer, 1995
pCAT232	Proviene de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>bfpA-cat</i> de los nucleótidos - 232 a +36.	Puente <i>et al.</i> 1996
pUST166	Proviene del pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>perA-cat</i> de los nucleótidos - 166 a +69.	Martínez-Laguna <i>et al.</i> 1999
pCS-T	Proviene del pMPM-K3, contiene al gen <i>perA</i> , expresado bajo el promotor <i>tac</i> .	Sánchez-San Martín <i>et al.</i> 2001

pMAL-c2	Vector fagémido para fusión y expresión de proteínas; replicón ColE1, P _{tac} <i>malE::lacZ lac^r bla</i>	New England Biolabs
pMALC2xa	Vector para construcción de fusiones a proteína de unión a maltosa (MBP por sus siglas en inglés)	New England Biolabs
pAIG307	Contiene la fusión transcripcional <i>bfpA-cat</i> derivado de pCAT232.	Ibarra <i>et al.</i> No reportado
pYML-K3 PerA	Proviene del pMPM-K3 contiene la fusión transcripcional <i>perA-cat</i> .	Este estudio
pK3 mut PerA D100A	pCS-T contiene la mutación en <i>perA</i> D100A	Este estudio
pK3 mut PerA D101A	pCS-T contiene la mutación en <i>perA</i> D101A	Este estudio
pK3 mut PerA E116A	pCS-T contiene la mutación en <i>perA</i> E116A	Este estudio
pK3 mut PerA D168A	pCS-T contiene la mutación en <i>perA</i> D168A	Este estudio
pK3 mut PerA E234A	pCS-T contiene la mutación en <i>perA</i> E234A	Este estudio
pMALc2- <i>perA</i> Y29A	Mutación en <i>perA</i> Y29A insertada en pMAL-C2xa	Este estudio
pMALc2- <i>perA</i> E116A	Mutación en <i>perA</i> E116A insertada en pMAL-C2xa	Este estudio
pMALc2- <i>perA</i> D150A	Mutación en <i>perA</i> D150A insertada en pMAL-C2xa	Este estudio
pMALc2- <i>perA</i> D168A	Mutación en <i>perA</i> D168A insertada en pMAL-C2xa	Este estudio
pMALc2- <i>perA</i> D177A	Mutación en <i>perA</i> D177A insertada en pMAL-C2xa	Este estudio
pMALc2- <i>perA</i> E234A	Mutación en <i>perA</i> E234A insertada en pMAL-C2xa	Este estudio

Condiciones de crecimiento: Los cultivos se crecieron a 37°C en medio líquido Luria-Bertani (LB) (Sambrook y Russell, 2001) o medio DMEM (“Dulbecco’s modified Eagle médium”), con glucosa (0.45% w/v) y L-glutamina (584 mg/l) y enriquecido con 1% LB. Cuando fue preciso se agregó al medio ampicilina o kanamicina (Sigma Chemical) a una concentración de 100 ó 25 µg /ml, respectivamente. Se partió de un pre-cultivo de toda la noche a 37°C en medio LB. Una vez centrifugado el cultivo, las pastillas bacterianas se resuspendieron en PBS, pH 7.4, con una DO₆₀₀ de 1. Se tomaron 50 mililitros de una dilución 1:50 de esta suspensión en DMEM y se incubaron en un baño de agitación a 200 rpm (Gyromax 929; Amerex Instruments, Inc.) a las temperaturas indicadas. Se recolectaron muestras cada hora para determinar la DO₆₀₀ y realizar el ensayo de actividad de Cat. La máxima acumulación de actividad de Cat fue el equivalente al inicio de la fase estacionaria de crecimiento, la mayoría de los experimentos se efectuaron con una OD₆₀₀ de 1.2 de crecimiento celular, que corresponde a 7-8 h de crecimiento en DMEM (Puente *et al.* 1996; Martínez-Laguna *et al.* 1999; Sambrook y Russell, 2001; Ibarra *et al.* 2003).

Cuando el estudio involucró el crecimiento de cultivos en diferentes condiciones ambientales se realizaron por triplicado en baño de agitación a 37°C, a 40°C y a 37°C más (NH₄)₂SO₄ a una concentración de 20 mM.

Manipulación y análisis del DNA: Todas las manipulaciones del DNA se realizaron mediante técnicas convencionales de genética y biología molecular (Sambrook y Russell, 2001; Moore y Dowhan, 2002). El DNA plasmídico de las células de *E. coli* se aisló por el método de lisis alcalina (Morelle, 1989), que consiste en crecer 2 ml de cultivo en LB con el antibiótico adecuado a 37°C en incubadora con agitación, centrifugar (Eppendorf 5810R) 1 ml de cultivo a 1500 x g durante 5 min, retirar el sobrenadante y resuspender la pastilla bacteriana en 200 µl de solución

amortiguadora (“*buffer*”) GTE (glucosa 50 mM, Tris 25 mM pH 8, EDTA 10 mM); después de 5 min a temperatura ambiente (RT), agregar 400 μ l de solución alcalina preparada en fresco (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y mezclar por inversión varias veces, después de 5 min en hielo, agregar 300 μ l de 7.5 M de acetato de amonio; mezclar suavemente pocos segundos, mantener en hielo 10 min. Centrifugar a 10,000 rpm durante 3 minutos. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, desechar la pastilla. Agregar 0.6 vol de isopropanol, mezclar e incubar 10 min a RT. Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min. Desechar el sobrenadante y agregar 70% (v/v) de etanol; centrifugar a 12,000 rpm durante 1 min. Disolver la pastilla en 20 μ l de TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA).

Las enzimas de restricción y modificación de DNA (Invitrogene Corporation o New England Biolabs) se usaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos empleados para amplificación por PCR fueron sintetizados por Invitrogene Corporation. Las reacciones de PCR se efectuaron en un volumen de 50 μ l usando Taq DNA polimerasa (Invitrogene Corporation) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos marcados radioactivamente [- 32 P]-ATP (6000 Ci mmol/l) Perkin-Elmer, para la secuenciación de las mutaciones en *PerA*.

Aislamiento de RNA: El RNA total se aisló de las muestras de cultivo recolectadas después de 4-5 h de crecimiento exponencial en DMEM (0.45%) a 37°C (OD_{600} 0.6-0.8). Se utilizó el kit RNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración y la calidad del RNA se definieron midiendo la A_{260} y A_{280} .

Mutagénesis sitio dirigida de perA: Se efectuó con el plásmido pCST, los oligonucleótidos iniciadores de la Tabla 3 y por el método para mutagénesis sitio-dirigida “Quik change”. Este método consiste en que 0.5 pmoles de plásmido se

añaden a una reacción de PCR que contiene 25 μ l de solución amortiguadora de 1x: (Tris HCl 20 mM, pH 7.5; MgCl₂ 8 mM), 12-20 pmoles de cada iniciador, 250 μ M de cada dNTP, 2.5 U Taq *pf*x polymerase, 2.5 U de Taq “*enhancer*” (Invitrogene). Los parámetros de reacción fueron 1 ciclo de 1 min a 95°C; seguido de 25 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 4 min a 72°C. La solución se trató con *DpnI* (10 U) para eliminar el DNA parental, incubándolas a 37°C durante 30 min. La solución tratada se transformó en células competentes de *E. coli*.

Verificación de las mutaciones: Se extrajeron plásmidos partiendo de 1 a 6 colonias y se digirieron con enzimas de restricción (*EcoRI* y *BamHI*) para su análisis por electroforesis en agarosa al 1% para verificar su tamaño. Uno o dos de los plásmidos, correspondientes a cada una de las mutaciones, fueron secuenciados para confirmar las mutaciones. La secuenciación se realizó mezclando 4 μ l de la reacción de secuencia (6 μ l de DNA, 6.75 μ l de agua, 2 μ l de solución amortiguadora de reacción, 2 μ l de primer marcado [³²P-ATP] y 0.75 μ l de Thermo sequenase DNA polymerase) con 4 μ l de cada ddNTP y bajo el siguiente programa de reacción: 50 ciclos de 45 seg a 95°C, 30 seg a 47°C y 1 min a 72°C. Después cada una de las muestras se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 30%, y expuestas a una película de Rx durante 24 h (Shendure *et al.* 1996; Sambrook y Rusell, 2001).

Transformación celular: Células competentes de *E. coli* MC4100 preparadas en el laboratorio (Casadaban, 1976), se transformaron con cada una de las cepas de EPEC mutantes en *perA* (pK3 mut PerA, ver Tabla 2) por el método de cloruro de calcio. Se tomó una colonia y se cultivó a una OD₆₀₀ = 0.6, se resuspendió dos veces con 200 mM de CaCl₂ frío y 20% de glicerol. Cada uno de los plásmidos pK3 mut PerA (Tabla 2) (50-100 ng) se mezcló con 45 μ l de células competentes, se incubaron en hielo durante 40 min, se les aplicó un choque térmico a 42°C

durante 45 seg, se agregó 1 ml de LB a cada tubo, y se incubaron las células a 37°C durante 1 hora para permitir la expresión del plásmido. Después se llevaron a una placa de medio sólido adecuado y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Construcción de fusiones transcripcionales y ensayos enzimáticos: Para evitar incompatibilidad, entre los plásmidos que llevan las fusiones de *per* y de *bfp* al gen *cat* y, los plásmidos de las mutantes en *rpoA* y en *rpoD*, las fusiones se trasladaron al plásmido pMPM-K3 amplificando por PCR las regiones reguladoras de ambos genes blanco. Los plásmidos con las fusiones obtenidas se introdujeron por electroporación en las cepas E2348/69 (silvestre), B171-10 (sin EAF) y MC4100 (K-12) de *E. coli*, y su nivel de expresión se midió a través del ensayo de actividad de Cat, preparando el extracto crudo y lavándolo con una solución amortiguadora de TDTT (tris-ditiotreitol), se centrifugó, se resuspendió y se sometió a pulsos de ultrasonido en hielo. Las velocidades de reacción se obtienen por cambios en la absorbancia a 405 nm cada 5 segundos durante 5 minutos de reacción y se analizaron y extrapolaron por medio del “software KC4” en un lector de microplaca modelo ELX 808 (Puente *et al.* 1996).

Por otro lado, se elaboró la construcción del pYML-PerA partiendo del plásmido pUST166 (Martínez-Laguna *et al.* 1999), que contiene la fusión transcripcional *perA-cat*, la fusión se cortó con *Sall* (5010)/*KpnI* (1723) en sitios inducidos por los iniciadores pUST-Sal1F y pUST-Kpn1R (Tabla 4) y se ligó el insertó en *Sall* (1765)/*KpnI* (1790) del plásmido pCST (Sánchez-San Martín *et al.* 2001), que contiene la región reguladora de *perA* silvestre. Su efectividad se evaluó por actividad específica de Cat en el fondo genético B171-10 (EPEC EAF⁻), por PCR con iniciadores UBfpT81F, SeqCAT1R, CAT552R y CBfpT614R (Tabla 4), 30 ciclos a 95°C-50°C-72°C y, por digestión enzimática con *EcoRV*. El plásmido resultante se denominó pYML-PerA.

Ensayo de la Cloranfenicol Acetil Transferasa (Cat): El ensayo Cat se efectuó de acuerdo con el descrito en investigaciones anteriores (Martínez-Laguna *et al.* 1999). Para la preparación de los extractos crudos se recolectaron por centrifugación (13200 rpm) muestras celulares y se lavaron con 1 ml de solución amortiguadora de TDTT (Tris-HCl 50 mM, pH 7.8, y DL-ditiotreitol 30 mM). Las pastillas bacterianas se resuspendieron en 500 µl de TDTT y sometidas a pulsos de ultrasonido en hielo hasta que se aclararan. Las células intactas y los detritos se eliminaron por centrifugación (13200 rpm) durante 15 min a 4°C, y se transfirieron los sobrenadantes a tubos limpios. Para el ensayo Cat, se colocaron 5 µl de cada extracto por duplicado en una placa ELISA de 96 pozos y se agregaron 200 µl de la mezcla de reacción que contiene DNTB 1 mM [5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico)] (Boehringer Mannheim)/0.1mM acetil-CoA (Pharmacia Biotech)/0.1mM cloranfenicol (Sigma Chemical) en Tris-HCl 0.1 M, pH 7.8. Se leyeron los cambios en absorbancia a 410 nm y se registraron cada 5 seg durante 3 min, utilizando un programa de lecturas en microplaca por ultra exploración, equipo ELx808 y software KC4 (Bio-Tek Instruments) en modo de cinética. Las actividades se obtuvieron por interpolación con una curva estándar, la que incluyó cloranfenicol acetil transferasa purificada (Sigma Chemical) en concentraciones de 0-2500 U/ml.

La concentración de proteínas de los extractos celulares usados en los ensayos Cat se determinó empleando un equipo para análisis de proteínas (BCA protein assay kit, Pierce) colocando 10 µl de cada extracto por duplicado más 200 µl de reactivos. Estos valores sirvieron para calcular la actividad específica de Cat. Albúmina sérica bovina (BSA, "Bovine Serum Albumine"), sirvió como un estándar en la lectura de proteínas. Cada valor representa el promedio de actividad obtenida de por lo menos tres experimentos independientes.

Expresión y purificación de proteínas fusionadas a MBP: La expresión y purificación de la fusión proteína de unión a maltosa (MBP)-PerA, se efectuó según la metodología descrita a continuación (Munson y Scott, 1999). El plásmido de expresión para PerA pMAL-c2 se construyó por amplificación del gen *perA* silvestre y de cada una de las mutantes (Y29A, E116A, D150A, D168A, D177A y E234A) (Tabla 2). A partir del plásmido pCST con *Taq* DNA polimerasa. Clonado en fase en el extremo 3' del gen *malE* en pMALC2xa (New England Biolabs), entre los sitios de restricción *Bam*HI y *Pst*I. La cepa BL21/pLys7, transformada con pMALc2-*perA* mutantes, se cultivó en medio LB con 0.2% de glucosa y 100 µg/ml de ampicilina a 30°C con agitación de 250 rpm. La expresión de MBP-PerA se indujo por adición de IPTG a 0.3 mM, cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.5 a 0.7, se incubó 3 h más, recolectando células bacterianas cada hora, centrifugándolas a 4°C, cada pastilla se lavó una vez con una solución fría amortiguadora de columna (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM -mercaptoetanol) y concentrada 100 veces con la misma solución. Las células se sometieron a pulsos ultrasónicos de 30 seg a 4°C y con lapsos de 30 seg de reposo. Los extractos crudos se obtuvieron por centrifugación a 14000 rpm durante 30 min a 4°C.

MBP-PerA se unió a una columna de amilosa equilibrada con la solución amortiguadora a temperatura ambiente (RT), cargando el extracto en la columna, con un flujo de 200 µl por minuto. Después la columna se coloca en hielo durante 1 h con agitación a 160 rpm. Lavar con 12 vol de solución amortiguadora (Tris-HCL 20 mM pH 7.4, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM). Elusión de la proteína con 3 vol de la misma solución, enriquecida con maltosa a 10 mM. La concentración de las proteínas purificadas se estableció por el método de Bradford y se analizó por SDS-PAGE al 10%.

Ensayos de cambio en la movilidad por electroforesis (EMSAs): Los fragmentos de DNA amplificados por PCR (209 pb para *bfpA* y 277 pb para *perA*) se incubaron en una solución amortiguadora de unión (HEPES 25 mM [pH 7.9], KCl 40 mM, MgCl₂ 3 mM, ditioneitol 1 mM [DTT], EDTA 0.1 mM, glicerol 5%) con diferentes concentraciones de MBP-PerA en un volumen final del 20 a 25 µl a RT durante 20 min. Las muestras se cargaron en un gel de acrilamida nativa al 6% y corrieron a 120 V a RT. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron a través del sistema de imagen BioSpectrum UVP (UVP, LLC).

Hibridación por "slot-blot": Se efectuó en membranas de nylon (Boehringer Mannheim) en las que se fijó 10 y 20 µg por canal de RNA total desnaturalizado, utilizando el equipo PR600 slot-blot (Hoefer Scientific Instruments), según instrucciones del fabricante. Las membranas se incubaron 6 h en una solución de prehibridación conteniendo formamida al 20%, SSC 6X, solución Denhardt's 2X y 200 µg/ml de DNA de esperma de salmón (Sambrook y Russell, 2001; Brown *et al.* 2004).

Se realizó la hibridación por 14 h, a 42°C en solución fresca que contiene una sonda específica marcada con [³²]-dCTP con el kit Random primer (Pharmacia). Se lavaron las membranas 2 veces con SSC 2X y 0.1 de SDS, y se expusieron a una película de Rx durante 24 h.

Tabla 4. Oligonucleótidos iniciadores utilizados en este estudio

Nombre	Secuencia	Característica	Referencia
PerA D100A-F PerA D100A-R	5'-GCATTCAATATCATCT <u>GCG</u> GACTCTTGTTATG-3' 5'-ATAACAAGAGTCC <u>G</u> CAGATGATATTGAATGC-3'	Introduce mutación por A en D	Este estudio
PerA D101A-F PerA D101A-R	5'-GCATTCAATATCATCTGAT <u>GCG</u> TCTTGTTATG-3' 5'-CATAACAAGAC <u>G</u> CATCAGATGATATTGAATGC-3'	Introduce mutación por A en D	Este estudio
PerA E116A-F PerA E116A-R	5'-CTGCGAACCTCAAT <u>GCG</u> ATGCAATTGAATATAG-3' 5'-CTATATTCAATTGCAT <u>GCG</u> ATTGAGGTTTCGCAG-3'	Introduce mutación por A en E	Este estudio
PerA D168A-F PerA D168A-R	5'-GCTTCATCTAAGAGCATCGT <u>GCG</u> GAGGGTTATAAAAGTAATTGAG-3' 5'-CTCAATTACTTTTATAACCCT <u>GCG</u> TACGATGCTCTTAGATGAAGC-3'	Introduce mutación por A en D	Este estudio
PerA E234A-F PerA E234A-R	5'-GAACTACTGATAAAAACATAGAT <u>GCG</u> ATATCTTGTTGGTTGGG-3' 5'-CCCAACCAAAACAAGATAT <u>GCG</u> ATCTATGTTTTATCAGTAGTTC-3'	Introduce mutación por A en E	Este estudio
UBfpT81F CBfpT614R	5'-CACCTTGAAAAATATCAGTA-3' 5'-TTTTAAAAGCTTTTTTGTGTTGC-3'	Región interna de <i>perA</i>	Santana-Anaya, 2004 Tecpanecatí-Xihuitl, 2003
T7-BH1-FW TaFB-2862R	5'-GGTTAATGCTTGGATCCAAAAAAG-3' 5'-TTGTTCTGCAGTTTCGAGTGCTC-3'	Introduce sitio <i>Bam</i> H1 Introduce sitio <i>Pst</i> 1	Martínez-Laguna <i>et al.</i> 1999
BfpA 2461F BfpA 2660R	5'-AATCCTCCATGAAGCCAG-3' 5'-AAAACATAAAAAGAC-3'	Región reguladora de <i>bfpA</i>	Martínez-Laguna <i>et al.</i> 1999
SeqCAT1R BfpA 37F BfpA 506R	5'-CGGTGGTATATCCAGTGAT-3' 5'-GGTCTGTCTTTGATTGAATCTG-3' 5'-CGCTTCAGCAGGAGTAATAG-3'	Fragmento inicial <i>perA-cat</i> Expresión de <i>bfpA</i> por RT-PCR	Este estudio
PerA D100A-F PerA E234A-R	5'-GCATTCAATATCATCTGCGGACTCTTGTTATG-3' 5'-CCCAACCAAAACAAGATATCGCATCTATGTTTTATCAGTAGTTC-3'	Expresión de <i>perA</i> por RT-PCR	Este estudio
CAT 552R	5'-CGTTTCAGTTTGCTCATGGA-3'	Fragmento medio <i>perA-cat</i>	Este estudio
pCSTBamH1F pCST Sac1R	5'-GGCAATAAA <u>G</u> GATCCATAGGAAACAAAC-3' 5'-GATTTTAAAGAGCTCTAACAAAACTTATG-3'	Introduce sitio <i>Bam</i> H1 Introduce sitio <i>Sac</i> 1	Este estudio
pUST Sal1F pUST Kpn1R	5'-GCCACCTGTCGACTAAGAAAC-3' 5'-CCGCTTCTGGGTACCGATTTATTCTG-3'	Introduce sitio 5'- <i>Sal</i> 1 Introduce sitio 3'- <i>Kpn</i> 1	Este estudio

Las secuencias subrayadas indican sitios de restricción o cambios para generar una mutante.

Expresión de *bfpA* y de *perA* bajo dominancia negativa de mutantes en subunidad alfa y en subunidad sigma. Teniendo los plásmidos pAIG307 (*bfpA-cat* + *perA*) (Ibarra et al. 2003), pYML-K3 (*perA-cat* + *perA*), pCAG (mutantes de la subunidad sigma de la RNAP) donados por la Dra. Carol Gross de la Universidad de California en San Francisco (Tabla 6), y pHTf1 y pREII (mutantes de la subunidad alfa de la RNAP) donados por el Dr. Richard Gourse de la Universidad de Wisconsin-Madison (Tabla 7) se transformaron en el fondo genético B171-10 EAF⁻, para su análisis por actividad específica de Cat.

Tabla 5. Esquema de estudio de actividad Cat de *bfpA* y de *perA* bajo influencia de la RNAP

Subunidad	RNAP + pAIG 307 ^{Km} (<i>bfpA-cat</i> + <i>perA</i>)
Subunidad	RNAP + pYML-K3 ^{Km} (<i>perA-cat</i> + <i>perA</i>)
Subunidad	RNAP + pAIG 307 ^{Km} (<i>bfpA-cat</i> + <i>perA</i>)
Subunidad	RNAP + pYML-K3 ^{Km} (<i>perA-cat</i> + <i>perA</i>)

Tabla 6. Lista de mutantes subunidad -CTD de la RNAP

Mutante	Aminoácido mutagenizado
pCAG ^{Ap} /rpoD silvestre	Subunidad sigma silvestre
pCAG ^{Ap} / EA574	Ácido glutámico
pCAG ^{Ap} / IA590	Isoleucina
pCAG ^{Ap} / EA591	Ácido glutámico
pCAG ^{Ap} / KA593	Lisina
pCAG ^{Ap} / LA595	Leucina
pCAG ^{Ap} / RA596	Arginina
pCAG ^{Ap} / KA597	Lisina
pCAG ^{Ap} / LA598	Leucina
pCAG ^{Ap} / RA599	Arginina
pCAG ^{Ap} / HA600	Histidina
pCAG ^{Ap} / SA602	Serina
pCAG ^{Ap} / RA603	Arginina
pCAG ^{Ap} / EA605	Ácido glutámico
pCAG ^{Ap} / RA608	Arginina
pCAG ^{Ap} / DA612	Ácido aspártico
pCAG ^{Ap} / DA613	Ácido aspártico
pCAG ^{Ap} / MA1	Metionina
pCAG ^{Ap} / MA2	Metionina

Tabla 7. Lista de mutantes subunidad -CTD de la RNAP

Mutante	Aminoácido mutagenizado	Mutante	Aminoácido mutagenizado
pHTf1 <i>rpoA</i> wt ^{Ap}	Subunidad silvestre	pREII <i>rpoA</i> T292A ^{Ap}	Treonina
pHTf1 <i>rpoA</i> R255A ^{Ap}	Arginina	pREII <i>rpoA</i> P293A ^{Ap}	Prolina
pHTf1 <i>rpoA</i> P256A ^{Ap}	Prolina	pREII <i>rpoA</i> N294A ^{Ap}	Asparagina
pHTf1 <i>rpoA</i> V257A ^{Ap}	Valina	pREII <i>rpoA</i> L295A ^{Ap}	Leucina
pHTf1 <i>rpoA</i> D258A ^{Ap}	Ácido aspártico	pREII <i>rpoA</i> G296A ^{Ap}	Glicina
pHTf1 <i>rpoA</i> D259A ^{Ap}	Ácido aspártico	pREII <i>rpoA</i> K297A ^{Ap}	Lisina
pHTf1 <i>rpoA</i> L260A ^{Ap}	Leucina	pREII <i>rpoA</i> K298A ^{Ap}	Lisina
pHTf1 <i>rpoA</i> E261A ^{Ap}	Ácido glutámico	pREII <i>rpoA</i> S299A ^{Ap}	Serina
pHTf1 <i>rpoA</i> L262A ^{Ap}	Leucina	pREII <i>rpoA</i> L300A ^{Ap}	Leucina
pHTf1 <i>rpoA</i> T263A ^{Ap}	Treonina	pREII <i>rpoA</i> T301A ^{Ap}	Treonina
pHTf1 <i>rpoA</i> V264A ^{Ap}	Valina	pREII <i>rpoA</i> E302A ^{Ap}	Ácido glutámico
pHTf1 <i>rpoA</i> R265A ^{Ap}	Arginina	pREII <i>rpoA</i> I303A ^{Ap}	Isoleucina
pHTf1 <i>rpoA</i> S266A ^{Ap}	Serina	pREII <i>rpoA</i> K304A ^{Ap}	Lisina
pHTf1 <i>rpoA</i> N268A ^{Ap}	Asparagina	pREII <i>rpoA</i> D305A ^{Ap}	Ácido aspártico
pHTf1 <i>rpoA</i> C269A ^{Ap}	Cisteína	pREII <i>rpoA</i> V306A ^{Ap}	Valina
pHTf1 <i>rpoA</i> L270A ^{Ap}	Leucina	pREII <i>rpoA</i> L307A ^{Ap}	Leucina
pHTf1 <i>rpoA</i> K271A ^{Ap}	Lisina	pREII <i>rpoA</i> S309A ^{Ap}	Serina
pREII <i>rpoA</i> E273A ^{Ap}	Ácido glutámico	pREII <i>rpoA</i> R310A ^{Ap}	Arginina
pREII <i>rpoA</i> I275A ^{Ap}	Isoleucina	pREII <i>rpoA</i> G311A ^{Ap}	Glicina
pREII <i>rpoA</i> H276A ^{Ap}	Histidina	pREII <i>rpoA</i> L312A ^{Ap}	Leucina
pREII <i>rpoA</i> Y277A ^{Ap}	Tirosina	pREII <i>rpoA</i> S313A ^{Ap}	Serina
pREII <i>rpoA</i> I278A ^{Ap}	Isoleucina	pREII <i>rpoA</i> L314A ^{Ap}	Leucina
pREII <i>rpoA</i> G279A ^{Ap}	Glicina	pREII <i>rpoA</i> G315A ^{Ap}	Glicina
pREII <i>rpoA</i> D280A ^{Ap}	Ácido aspártico	pREII <i>rpoA</i> M316A ^{Ap}	Metionina
pREII <i>rpoA</i> L281A ^{Ap}	Leucina	pREII <i>rpoA</i> R317A ^{Ap}	Arginina
pREII <i>rpoA</i> V282A ^{Ap}	Valina	pREII <i>rpoA</i> L318A ^{Ap}	Leucina
pREII <i>rpoA</i> Q283A ^{Ap}	Glutamina	pREII <i>rpoA</i> E319A ^{Ap}	Ácido glutámico
pREII <i>rpoA</i> R284A ^{Ap}	Arginina	pREII <i>rpoA</i> N320A ^{Ap}	Asparagina
pREII <i>rpoA</i> T285A ^{Ap}	Treonina	pREII <i>rpoA</i> W321A ^{Ap}	triptofano
pREII <i>rpoA</i> E286A ^{Ap}	Ácido glutámico	pREII <i>rpoA</i> P322A ^{Ap}	Prolina
pREII <i>rpoA</i> V287A ^{Ap}	Valina	pREII <i>rpoA</i> P323A ^{Ap}	Prolina
pREII <i>rpoA</i> E288A ^{Ap}	Ácido glutámico	pREII <i>rpoA</i> S325A ^{Ap}	Serina
pREII <i>rpoA</i> L289A ^{Ap}	Leucina	pREII <i>rpoA</i> I326A ^{Ap}	Isoleucina
pREII <i>rpoA</i> L290A ^{Ap}	Leucina	pREII <i>rpoA</i> D328A ^{Ap}	Ácido aspártico
pREII <i>rpoA</i> K291A ^{Ap}	Lisina	pREII <i>rpoA</i> E329A ^{Ap}	Ácido glutámico

RT-PCR. Para detectar los niveles de expresión del RNA de *perA* (439 pb), *bfpA* (249 pb) y 16S rRNA (500 pb), como control negativo no se añadió RNA. Se utilizó el kit Titan one tube RT-PCR (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante, colocando las siguientes mezclas de reacción en un tubo para PCR:

Mezcla 1	Mezcla 2
10.5 µl agua estéril	14 µl Agua estéril
4 µl dNTPs	10 µl <i>buffer</i> RT-PCR 5X
2.5 µl DTT	1 µl Enzima
1 µl Inhibidor de RNasa	25 µl Volumen total
1 µl Iniciador delantero	
1 µl Iniciador reverso	
5 µl RNA	
25 µl Volumen total	

Condiciones de reacción RT-PCR:

Ciclos	Temperatura y tiempo
1 x	50°C 30 min
1 x	94°C 2 min
10 x	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 30 seg • 54-57°C 30 seg • 68°C 45 seg
25 x	<ul style="list-style-type: none"> • 94°C 30 seg • 54-57°C 30 seg (<i>bfpA</i>, <i>perA</i>) 48°C 30 seg (16S) • 68°C 4 min + 5 seg por ciclo
1 x	68°C 7 min

Los productos de amplificación o amplicones se visualizaron en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y registrado por el sistema de imagen BioSpectrum UVP (UVP, LLC).

IX. RESULTADOS

EVALUACIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES EN PerA Y SU EFECTO SOBRE LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS OPERONES *bfp* Y *per*.

Con la finalidad de identificar los aminoácidos de PerA que pudieran estar involucrados en su función como activador transcripcional, se realizaron mutaciones puntuales a lo largo de la secuencia de la proteína. La elección de dichos residuos se basó en el análisis del alineamiento entre la secuencia primaria de PerA con la de algunos miembros del grupo de reguladores de virulencia de la familia AraC/XylS utilizando el programa de alineamiento Clustal W2 (Figura 6).

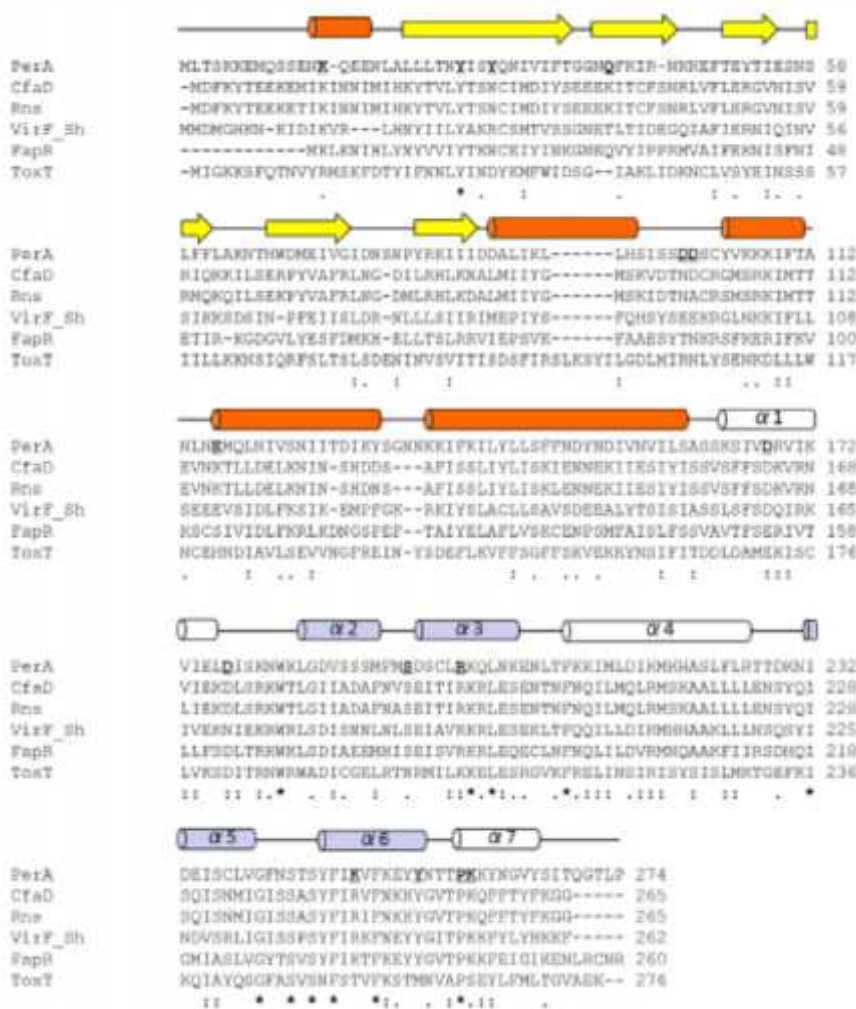


Figura 6. Análisis comparativo de la estructura primaria del regulador transcripcional PerA. Alineamiento por ClustaW2 (Larkin *et al.* 2007) con miembros de la familia AraC/XyIS como Rns, CfaD, VirF, FapR y ToxT. Los residuos altamente conservados se observan marcados con asterisco (*), los residuos conservados con dos puntos (:), y los semiconservados por un punto (.). La secuencia de aminoácidos de PerA se analizó utilizando Psipred. En el dominio amino terminal, las α -hélices se aprecian representadas por cilindros naranja, las hojas β por flechas amarillas y las regiones no estructuradas (asas) por líneas. En el dominio carboxilo terminal, las 7 α -hélices previstas ($\alpha 1 - \alpha 7$) están indicadas arriba de las secuencias como cilindros azules y blancos. Los cilindros azul claro denotan estructuras que forman parte de los motivos HTH, tipo AraC/XyIS, en coincidencia con las estructuras cristalizadas de MarA, Rob y ToxT (Lowden *et al.* 2010; Rhee *et al.* 1998; Kwon *et al.* 2000). Algunas de las mutaciones puntuales generadas en este trabajo y en el grupo de investigación están subrayadas y en negritas.

Con base en este análisis se seleccionaron residuos de aminoácidos ubicados en los extremos del dominio amino terminal, las porciones inicial, media y final del dominio carboxilo terminal, incluyendo sitios de probable unión con la RNAP y los motivos HTH1 y HTH2 de unión a DNA, así como mutaciones en la región conectora de PerA (Figura 7 A y B). Las mutaciones puntuales se realizaron por sustitución del residuo seleccionado por alanina mediante la técnica de PCR inverso, las mutantes generadas en el presente trabajo fueron D100, D101, E116, D168 y E234. La razón de la sustitución por alanina se fundamenta en que su inserción elimina los átomos de la cadena lateral después del carbono α , de esta forma puede deducirse a partir de estas mutaciones, el papel de los grupos funcionales de la cadena lateral en posiciones específicas, debido a que alanina (R = metilo de la cadena lateral) carece de las preferencias usuales del ángulo diedro en la cadena polipeptídica. Por el contrario, una inserción por glicina puede nulificar la cadena lateral, pero también puede introducir flexibilidad en la conformación de la cadena polipeptídica. De esta forma puede deducirse, a partir de las mutaciones por alanina, el papel de los grupos funcionales de la cadena lateral en posiciones específicas (Lefèvre *et al.* 1997). De manera adicional, en este trabajo se incluyó la caracterización de diferentes proteínas mutantes en PerA que fueron previamente generadas (Puente-García y Martínez-Laguna, comunicación personal), esto con la finalidad de realizar un análisis integral y generar la mayor cantidad de información respecto de la función de PerA. Las mutantes caracterizadas en este trabajo, generadas por el grupo de investigación fueron Y29A, D150A y D177A. Además, algunas de las mutantes generadas en el grupo, no fueron reemplazadas por alanina, sino por arginina, que es un aminoácido hidrofílico con fuerte carga positiva o por glicina que es un aminoácido sin carga no hidrofílico, esto debido a que se ha observado que los residuos de arginina y glicina mantienen la habilidad de incrementar la expresión de otros genes (Burgdorf *et al.* 2011; Eddabra *et al.* 2012).

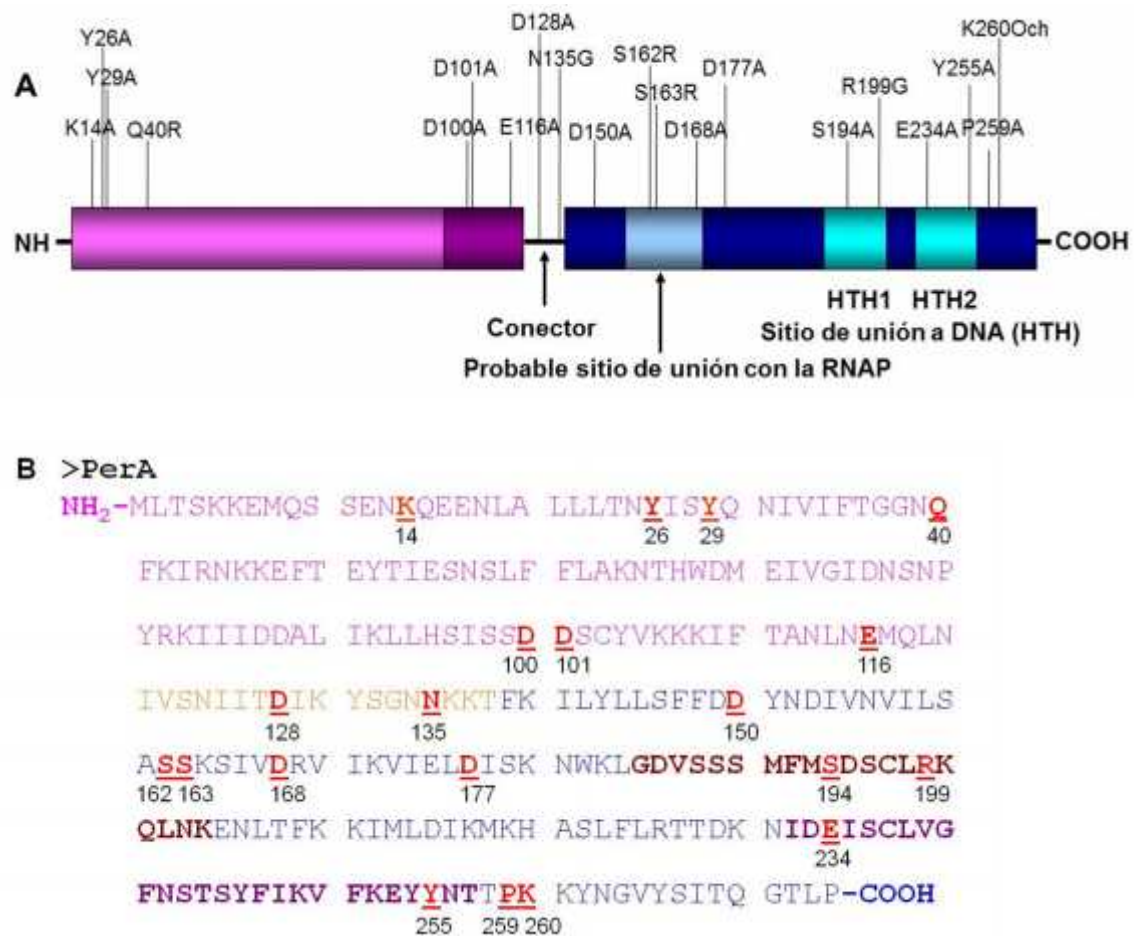


Figura 7. Estructura primaria y secuencia del activador transcripcional PerA. **A.** Representación lineal de la proteína PerA. **B.** Secuencia aminoacídica de PerA, rosa dominio amino terminal, amarillo región conectora, azul dominio carboxilo terminal con los motivos HTH1 (café) y HTH2 (morado) en negrita. Se muestran las mutaciones generadas en este trabajo y otros.

Los plásmidos portando cada una de las variantes en *perA* fueron transformados en el fondo genético de EPEC EAF⁻ (B171-10, ver tabla 2), para evaluar el efecto sobre la actividad transcripcional de las fusiones *bfpA-cat* y *perA-cat* por medio de ensayos de actividad de CAT.

El análisis del efecto de cada una de las proteínas mutantes se evaluó mediante 3 ensayos independientes de complementación de la actividad de CAT (Tabla 8) y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8, la cual presenta los resultados de las mutantes evaluadas en esta investigación y las valoradas por el grupo de investigación (Martinez-Laguna, comunicación personal; Ibarra *et al.* 2013).

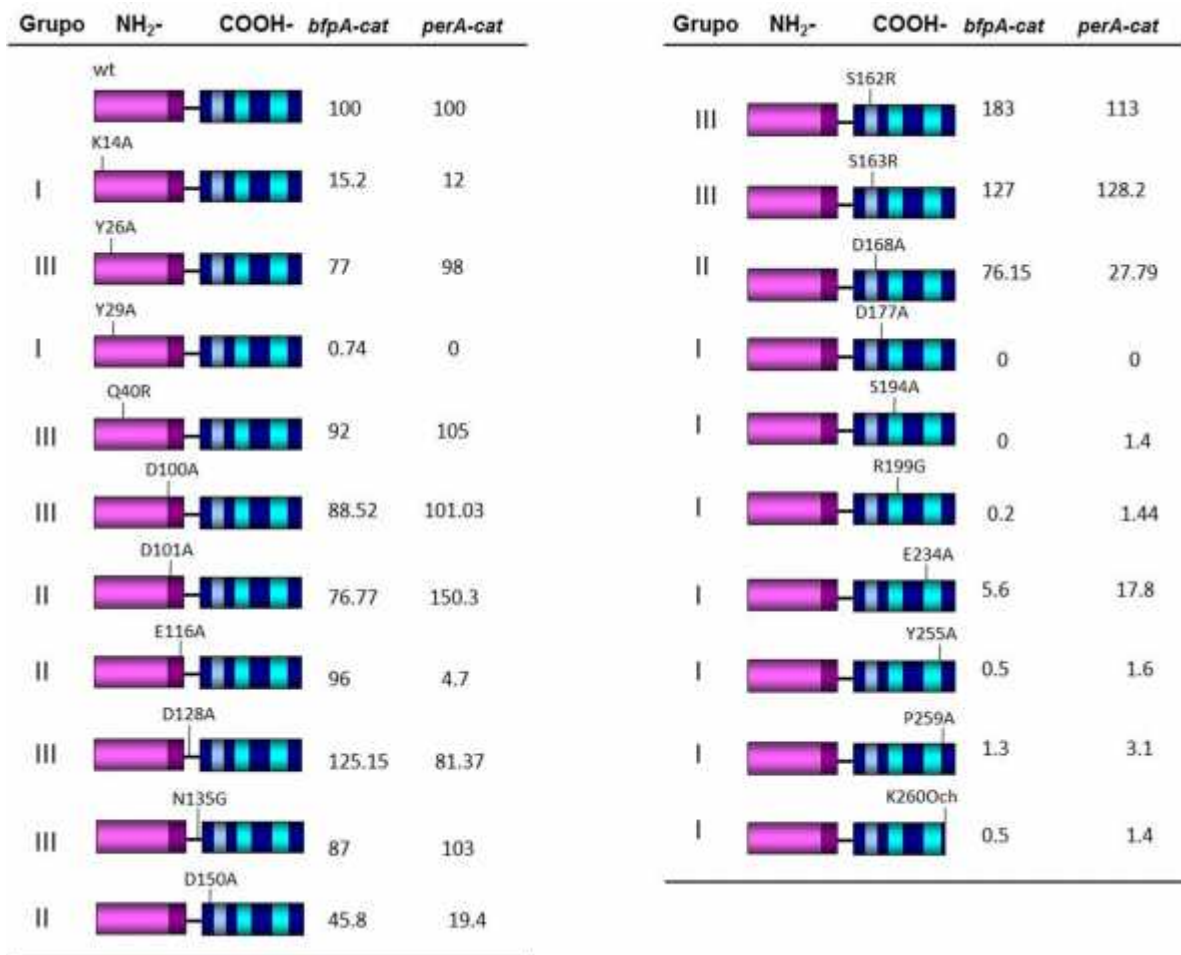


Figura 8. Representación esquemática de las proteínas mutantes de PerA y su efecto sobre la actividad transcripcional de los operones *bfp* y *per*. Los plásmidos portando cada una de las mutaciones en *perA* fueron transformados en la cepa EPEC B171-10 y las bacterias se inocularon para su crecimiento en medio DMEM a 37°C a una DO₆₀₀=1.4. Un mililitro de las muestras se tomó para preparar los extractos celulares y la determinación de la actividad de CAT. Los datos se expresaron como un porcentaje de expresión comparado con el resultado obtenido con la proteína silvestre, para cada una de las fusiones. Las mutantes se reunieron en tres grupos según sus fenotipos: I, severamente afectado (<15% de actividad); II, moderadamente afectado (>15% a <75% de actividad) pero capaz de activar sólo una de las fusiones o tener el efecto opuesto en la activación del promotor; y III, no afectadas o con actividad similar a la silvestre (>75%). Los datos presentados se obtuvieron de 3 ensayos independientes.

Los aminoácidos seleccionados fueron: polares con carga negativa (D100, D101, E116, D150, D168, D177, E234) y sin carga (Y29), el objetivo fue buscar aquellos residuos que tuvieran potencial y pudieran hacer interacción con la RNAP. De cada una de las mutantes seleccionadas, se evaluó la capacidad de activar las fusiones transcripcionales *bfpA-cat* y *perA-cat*, lo cual nos permitió, de acuerdo con el fenotipo presentado, reunir las mutantes en tres grupos (Figura 8). El grupo I incluye aquellas mutantes en PerA cuya función se ve drásticamente afectada o que muestran una actividad residual para ambos promotores *bfpA* y *perA*. El grupo II comprende mutantes en PerA capaces de activar sólo una de las fusiones transcripcionales o tienen el efecto opuesto en la activación del promotor. El grupo III incorpora las mutaciones cuyo efecto es similar a PerA silvestre.

De estas mutantes, cuatro se encuentran en el dominio amino terminal (Y29A, D100, D101 y E116), mientras que las otras cuatro se localizan en el dominio carboxilo terminal (D150, D168, D177 y E234).

Como se mencionó, se identificaron tres modelos o grupos de activación de PerA sobre las fusiones transcripcionales *bfpA-cat* y *perA-cat*; dentro del grupo I se incluyeron las mutantes Y29 y D177 por su incapacidad de activar ambas fusiones transcripcionales y, E234, localizada en el motivo HTH2, por presentar actividad menor y cercana al 15% para cada uno de los promotores *bfpA* y *perA*.

En el grupo III se localizó a la mutante D100A, debido a que presentó una actividad similar a la cepa silvestre, con un porcentaje de actividad superior al 75%, lo cual indica que esta mutante no participa en la interacción con los promotores de *bfpA* y de *perA*.

En vista del fenotipo mostrado, se seleccionaron las mutantes caracterizadas dentro del grupo II, D101, E116, D150 y D168. De estas solamente D101 presentó una sobre activación del promotor *perA*; en relación con la mutante en el residuo D150, ésta mostró una actividad moderada de ambos promotores tanto de *bfpA* como de *perA*. Por lo que respecta a las mutaciones en los residuos

E116 y D168, se observó un comportamiento interesante, dado que la capacidad de activación mostrada difiere entre promotores, puesto que E116 sólo fue capaz de activar la transcripción de *bfpA-cat*, mostrando una posible falta de interacción con el promotor *perA* en vista de la activación insuficiente de *perA-cat*, y la mutante D168A, activó en más del 75% una de las fusiones (*bfpA-cat*) y en 28% la fusión transcripcional *perA-cat*.

Estos resultados, conducen a inferir que las mutaciones en los residuos Y29A, D177A y E234A, que mostraron una activación menor al 20% (Figura 8), están involucradas en el reconocimiento del sitio promotor, lo que impide que activen a los promotores correspondientes *bfpA*, *perA* o ambos. No así, con el resto de las mutantes, de las cuales E116 y D168, exhibieron una menor habilidad para reconocer al promotor *perA*; lo que podría indicar una falta de unión con la región del DNA correspondiente a *perA*, siendo de forma más drástica con E116.

INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS MUTANTES DE PerA CON LAS REGIONES REGULADORAS DE *bfpA* Y *perA*.

A partir de los resultados obtenidos con los ensayos de actividad transcripcional, se seleccionaron las proteínas mutantes que se integraron dentro de los grupos I y II, en cuanto a su capacidad de activar uno o ambos promotores de *bfpA* y *perA*: residuos mutados K14, Y29, E116, D150, D168, D177, S194, R199, E234, Y255, P259, K260. Sin embargo, las mutaciones en los residuos K14, S194, R199, Y255A, P259 y K260, incluidas en el grupo I, sólo se mencionan por ser objeto de estudios anteriores.

Para investigar si la pérdida en la capacidad de activación se debía a que los residuos mutados son indispensables para el reconocimiento y unión a DNA se realizaron ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) con las

regiones reguladoras de *bfpA* (comprende el fragmento de -214 a -15) y *perA* (región -155 a +21).

Las secuencias que codifican para cada una de las proteínas mutantes seleccionadas, se clonaron en fase con el gen de la proteína de unión a maltosa (MBP) en los sitios *Bam*HI/*Pst*I en el plásmido pMALC2xa (Tabla 2). Las proteínas mutantes fusionadas a MBP fueron sobreexpresadas y purificadas (Figura 9, se muestra la purificación de la proteína silvestre, la purificación de las proteínas mutantes se observó de forma similar y ninguna de ellas mostró anomalía de expresión) (datos no mostrados), para posteriormente analizar su capacidad de unión a DNA. De manera adicional, se evaluó la capacidad de activación transcripcional de las proteínas mutantes de PerA fusionadas a MBP sobre las fusiones *bfpA-cat* y *perA-cat*, en el fondo genético B171-10. Los resultados obtenidos fueron similares con respecto a las versiones sin MBP (datos no mostrados).

Para los ensayos de unión, los fragmentos de *bfpA* y *perA* comprendiendo las regiones promotoras, fueron incubados con diferentes concentraciones de las proteínas MBP-PerA mutantes y analizadas mediante EMSA.

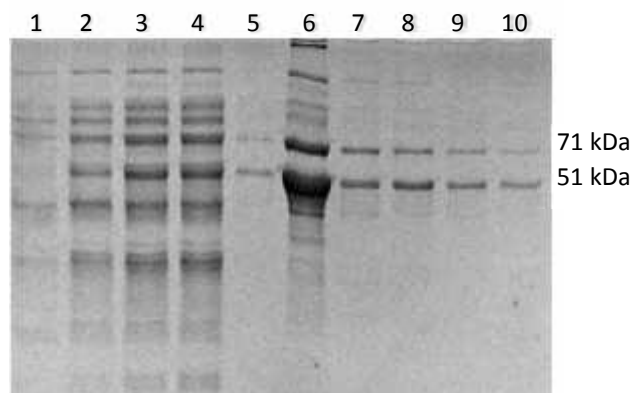


Figura 9. Purificación de la proteína PerA silvestre (y PerA mutantes). Condiciones de purificación: cultivo de 1 ml de precultivo en 100 ml LB más glucosa al 0.2% más ampicilina, a 30°C a una DO_{600} de 0.6, se induce con IPTG y se incuba 3 h más. El extracto crudo se pasa por columna de amilosa y se eluye con un tampón de columna enriquecido con maltosa 10 mM. Carriles: 1) Extracto no

inducido, 2) Extracto inducido con IPTG a 0.3 mM por: 2) 1h, 3) 2h, 3) 3h. Carriles 4 a 10 Fracciones de la 1 a la 6 de MBP-PerA purificada. La banda de 71 kDa corresponde a la proteína fusionada completa, mientras que la segunda de ca. 51 kDa corresponde a un producto trunco que contiene MBP y la porción del dominio amino terminal de PerA.

En la figura 10 se presentan los resultados de los ensayos de unión a DNA. Como control se utilizó la proteína PerA silvestre (Figura 10A). Se observó que la afinidad por el DNA es mayor por la región promotora de *perA*, puesto que el complejo proteína-DNA se forma a partir de una concentración de 596 nM, mientras que la concentración mínima para unirse al promotor de *bfpA* fue de 1.5 μ M.

En la figura 10B, se observa que la proteína PerA E116A, se une a las regiones reguladoras de *bfpA* y *perA* con la misma afinidad que PerA silvestre. Esta mutante fue capaz de activar la fusión *bfpA-cat*, pero no a la fusión *perA-cat*, ya que solo presentó una actividad específica de 5% (Figura 8). Esto indica que la incapacidad de activar la expresión de *perA* no es debido a la falta de unión al DNA.

La mutante PerA D168A (Figura 10C), se une a partir de una concentración de 3 μ M (*bfpA*) y 1.5 μ M (*perA*), lo que indica que presenta una menor afinidad por el DNA. Esto coincide con la disminución en la actividad transcripcional de *perA-cat* (Figura 8).

Finalmente, la figura 10D, muestra que el aminoácido E234, ubicado en el motivo HTH2, no es un residuo que intervenga en la unión a DNA, a pesar de que este motivo se ha identificado como participante en la unión a DNA (Gallegos *et al.* 1997). En vista de que la activación de las fusiones transcripcionales con esta mutante se vio reducida considerablemente, y, debido a que observamos que la formación del complejo DNA-proteína se da a partir de una concentración de 3 μ M

para *bfpA*, y de 1.5 μM para *perA*, aquí la afinidad es menor comparada con la proteína silvestre, este residuo pudiera interactuar con la RNAP.

Con base en las mutaciones de los aminoácidos y mediante los resultados obtenidos a través de estos ensayos, podemos deducir que las regiones próximas al conector, de ambos dominios, además del motivo HTH2, participan en la unión al promotor *bfpA* o *perA*.

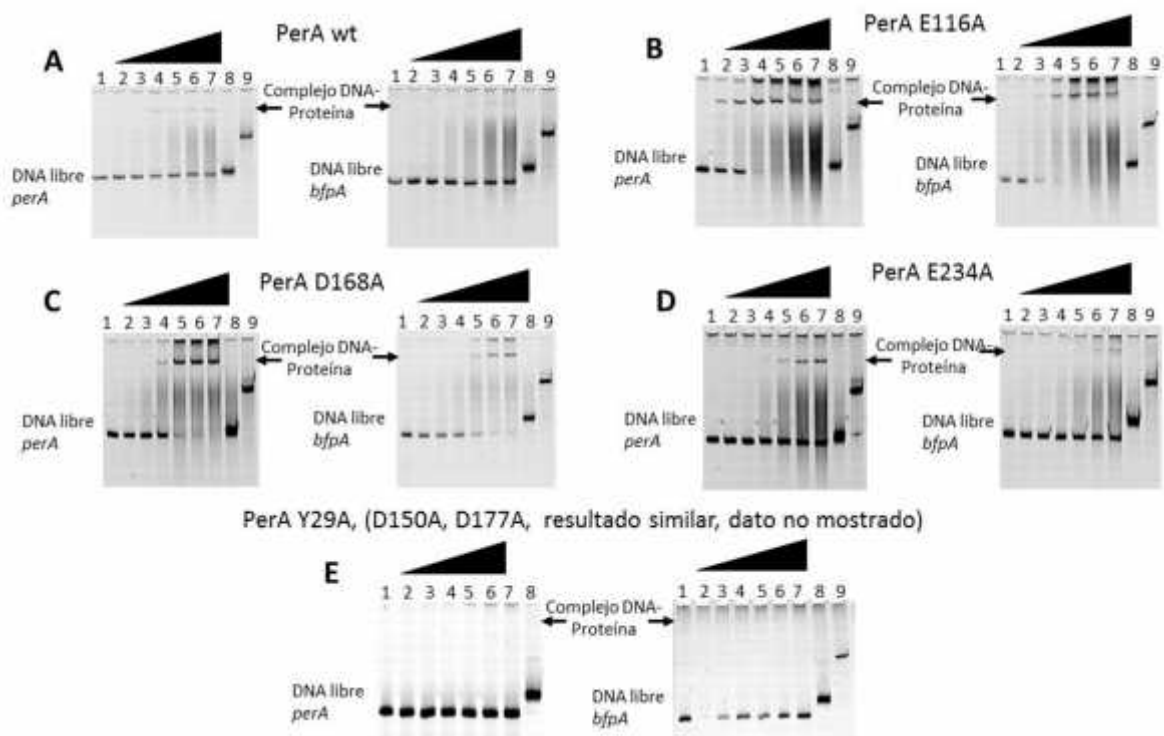


Figura 10. Determinación de la capacidad de unión al DNA mediante ensayos tipo EMSA de las regiones reguladoras de *bfpA* y *perA* con las proteínas mutantes de PerA. Se amplificaron por PCR por los fragmentos internos de las regiones reguladoras de *bfpA* y de *perA* y se incubaron con diferentes concentraciones (de las distintas proteínas MBP-PerA). Carriles 1 a 9 muestran las diferentes concentraciones de proteína: **(1)** 0 nM, **(2)** 298 nM, **(3)** 596 nM, **(4)** 1.5 μM , **(5)** 3 μM , **(6)** 6 μM , **(7)** 8 μM , **(8)** control negativo fragmento de la región interna de *perA*, con una concentración de proteína de 596 nM **(9)** control negativo fragmento del gen del RNA16S, bajo una concentración de 596 nM.

EFEECTO DE MUTACIONES EN PerA SOBRE LA ACTIVIDAD
TRANSCRIPCIONAL DE *bfpA* Y *perA* BAJO DIFERENTES
CONDICIONES AMBIENTALES.

Estudios previos, han demostrado que la expresión de los operones *bfpA* y *perA*, está regulada negativamente por diferentes condiciones ambientales, como temperatura y sales de amonio (Puente *et al.* 1996; Martínez-Laguna *et al.* 1999).

Con base en lo anterior, las mutaciones en los residuos de aminoácidos de PerA, construidas y analizadas en este trabajo (D100, D101, E116, D168 y E234), fueron evaluadas para investigar si tenían alguna participación en la regulación de la expresión bajo diferentes condiciones de represión, de los operones *bfp* y *per*. Para esto, los plásmidos que expresan las proteínas PerA D100A, D101A, E116A, D168A y E234A, fueron transformados en la cepa B171-10 (EPEC EAF⁻), para evaluar el efecto sobre la expresión de *bfpA-cat* y *perA-cat* (Figuras 11 y 12, presentan los datos concentrados, incluyendo otras mutantes realizadas dentro del grupo de investigación, con fines de comparación). Los ensayos se realizaron por triplicado en baño de agitación a 37°C, a 40°C y a 37°C en medio DMEM suplementado con (NH₄)₂SO₄ en una concentración de 20 mM.

Las expresiones de *bfpA-cat* (Figura 11) y de *perA-cat* (Figura 12) por parte de las mutantes Y29A, D150A, D177A y E234A, se redujeron drásticamente tanto a 40°C como en presencia de amonio. Considerando que su actividad específica a 37°C fue menor al 20%, para ambas fusiones, se esperaba que la expresión prácticamente se nulificara tanto en presencia de amonio como a 40°C. Esto porque de acuerdo con Puente *et al.* (Puente *et al.* 1996) y Martínez-Laguna *et al.* (Martínez-Laguna *et al.* 1999;) el incremento de la temperatura y la concentración de amonio reducen la expresión de *bfpA-cat* y de *perA-cat* en comparación con su activación a 37°C por PerA silvestre.

Por el contrario, las mutantes D100A, D101A, E116A y D168 presentaron un comportamiento interesante. La figura 11 muestra los porcentajes de actividad CAT específica del efecto de la temperatura y de la presencia de amonio en la activación de *bfpA-cat*, se observa que siguen un patrón similar entre las cuatro mutantes en PerA, que es de una expresión reducida tanto en presencia de amonio a 37°C como a 40°C sin amonio, siendo más notable para la mutante D168A, en comparación con el patrón de PerA silvestre.

En la figura 12 se muestran los resultados del efecto de las mutantes en PerA D100A, D101A, E116A y D168, sobre la expresión de *perA-cat*, el comportamiento de estas mutantes difiere considerablemente de PerA silvestre y de su efecto sobre *bfpA-cat*, debido a que ante la presencia de amonio se incrementa la expresión a un 40-50%, sin llegar a los niveles de expresión de las mutantes S162R y S163R. Mientras que, a una temperatura de 40°C, la expresión de *perA-cat*, bajo la influencia de D100A, es similar al comportamiento en presencia de la proteína silvestre, la mutación en D101, se escapa de la regulación favoreciendo una sobreexpresión de forma similar a como lo hacen las mutantes S162R y S163R; en contraste, en los ensayos de complementación con las mutantes E116A y D168A, se reduce la expresión de la fusión transcripcional *perA-cat*.

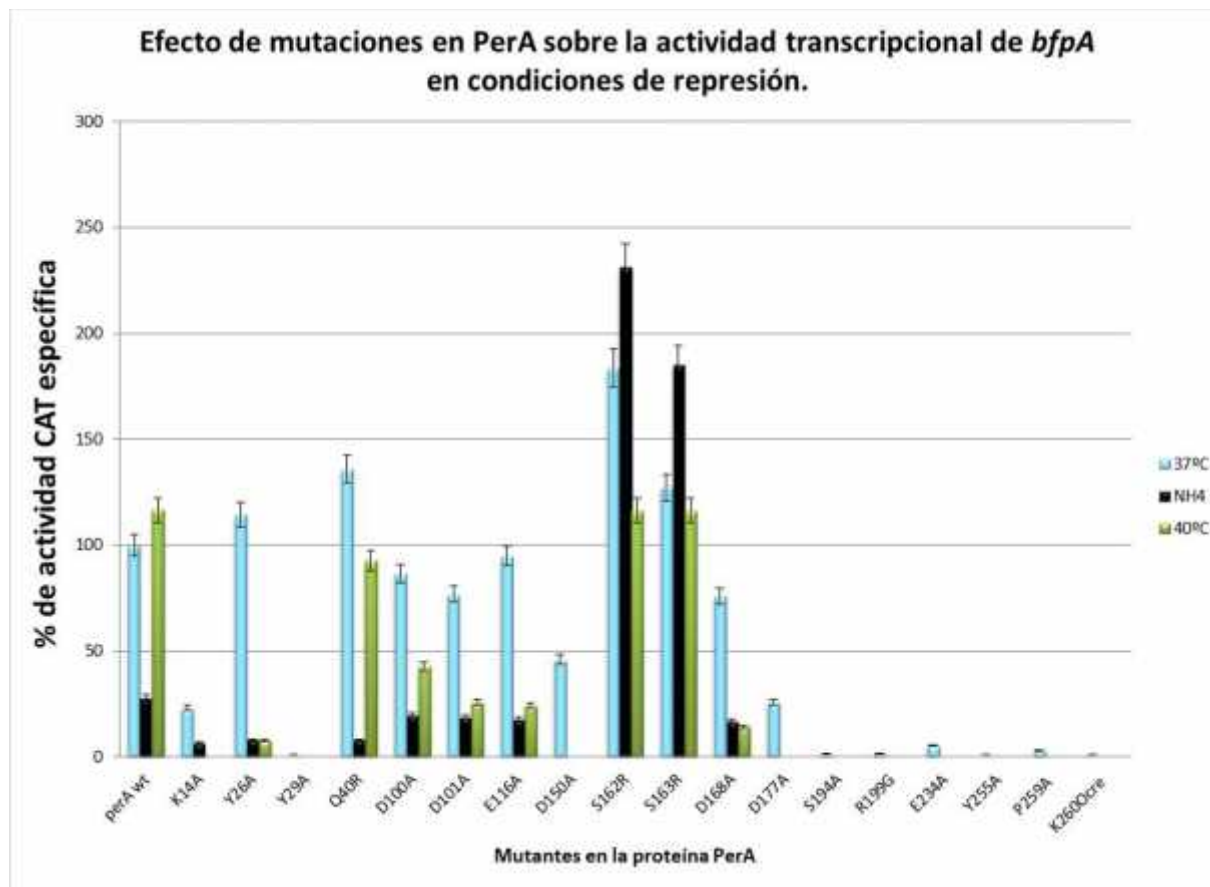


Figura 11. Efecto sobre la expresión de *bfpA-cat* de las mutantes en PerA ante diferentes condiciones ambientales. Los ensayos se realizaron por triplicado mediante un precultivo a 37°C y DO₆₀₀ 1.0, lavado con PBS, con este se inocularon 50 ml de DMEM, o DMEM + (NH₄)₂SO₄, se incubó a 37°C, a 37°C en presencia de amonio y a 40°C; la última muestra a DO₆₀₀ 1.2 se lavó con TDTT, para su lectura de actividad CAT: 5 µl más 200 µl de reactivos (DNTB, H₂O, AcCoA, Cm) y de proteínas: 10 µl más 200 µl de reactivos (BCA protein assay kit). Los resultados se muestran ± DT.

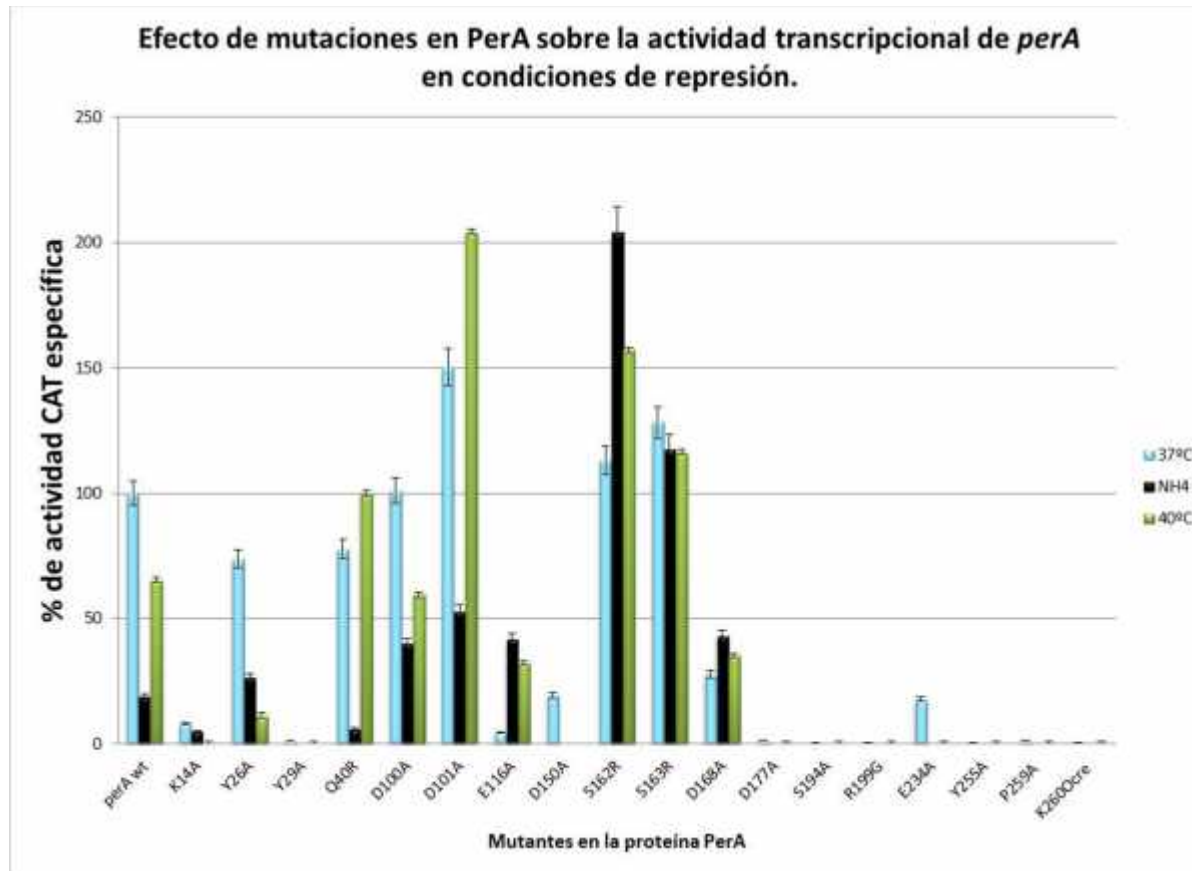


Figura 12. Efecto sobre la expresión de *perA-cat* de las mutantes en PerA ante diferentes condiciones ambientales. Los ensayos se realizaron por triplicado mediante un precultivo a 37°C y DO₆₀₀ 1.0, lavado con PBS, con este se inocularon 50 ml de DMEM, o DMEM + (NH₄)₂SO₄, se incubó a 37°C, a 37°C en presencia de amonio y a 40°C; la última muestra a DO₆₀₀ 1.2 se lavó con TDTT, para su lectura de actividad CAT: 5 µl más 200 µl de reactivos (DNTB, H₂O, AcCoA, Cm) y de proteínas: 10 µl más 200 µl de reactivos (BCA protein assay kit). Los resultados se muestran ± DT.

Las cuatro mutantes sobreexpresan la actividad de *perA* en presencia de amonio; recordando que PerA D100 y PerA D101 no reducen la expresión de *perA* en condiciones normales (37°C) y, que son residuos que no participan en la interacción con los promotores *bfpA*, *perA* o ambos. Sin embargo, cambios en los residuos E116 y D168, que son aquellos aminoácidos que disminuyen la actividad de la proteína sobre la región reguladora de *perA* y, no así sobre la de *bfpA*, aunque, aparentemente no participan en el reconocimiento de la región reguladora del operón *bfpA*, *perA* o ambos; debido a que las mutaciones no impiden la unión al DNA (Figura 10).

EFECTO DE MUTACIONES EN LAS SUBUNIDADES α Y σ^{70} DE LA RNAP SOBRE LA CAPACIDAD DE PerA PARA ACTIVAR LA EXPRESIÓN DE *bfpA* O DE *perA*.

Con la finalidad de determinar que residuos de aminoácidos de las subunidades α y σ^{70} de la RNAP, pudieran estar participando en la interacción con la proteína PerA, durante la activación de los promotores *bfpA* o *perA*, aunado al hecho de conocer el sitio de unión de PerA, en cada una de las regiones reguladoras tanto de *bfpA* como de *perA* (Bustamante *et al.* 1998; Martínez-Laguna *et al.* 1999; Ibarra *et al.* 2003), se realizaron ensayos de complementación, para analizar la expresión de *bfpA* y de *perA* en EPEC, bajo dominancia negativa de mutantes en *rpoA* (RNAP) y en *rpoD* (RNAP). Esto nos dará la premisa de posibles contactos entre el activador transcripcional PerA y la RNAP.

Para ello se cuenta con una colección de mutantes con sustituciones por alanina, en varios residuos de aminoácidos, en la subunidad α de la RNAP, amablemente donado por la Dra. Carol Gross, (Universidad de California en San Francisco, USA). También se tiene una colección de mutantes con sustituciones por alanina, en varios residuos de aminoácidos, en la subunidad σ^{70} de la RNAP

gentilmente obsequiado por el Dr. Richard Gourse, (Universidad de Wisconsin, USA).

Además, se cuenta con el plásmido pAIG307 que contiene la fusión transcripcional *bfpA-cat + perA* silvestre (datos no publicados), para realizar los ensayos de actividad CAT específica en presencia de cada uno de los bancos de mutantes de las subunidades σ^{70} de la RNAP. Sin embargo, se necesitaba una construcción similar que incluyera la fusión transcripcional *perA-cat* bajo el control de *perA* silvestre. En el presente estudio se realizó esta construcción partiendo, por un lado, del plásmido pUST166 (Martínez-Laguna *et al.* 1999) que contiene la fusión transcripcional, y, por otro contamos con el plásmido pCST (Sánchez-San Martín *et al.* 2001) que porta el gen *perA* silvestre. A la nueva construcción se le denominó pYML-PerA.

Los plásmidos pAIG307 y pYML-PerA, se utilizaron para realizar ensayos de complementación mediante sistemas de dos plásmidos, en el fondo genético EPEC EAF⁻ (*perA*-), con aquellos que contienen las mutantes en las subunidades σ^{70} de la RNAP. Con la finalidad de realizar un filtro para seleccionar algunas mutantes de estas subunidades, que reduzcan la expresión de *bfpA* y de *perA*, se desarrollaron cuatro sistemas (Tabla 5), y, cada uno se evaluó por actividad específica CAT; teniendo por un lado la fusión transcripcional *bfpA-cat + perA* (pAIG307) y por otro la fusión *perA-cat + perA* (pYML-PerA), de esta forma se controla la expresión de los promotores bajo la regulación de *perA* silvestre, permitiendo apreciar el efecto de la dominancia negativa de las mutantes en las subunidades σ^{70} de la RNAP.

Expresión de la fusión *bfpA-cat* en presencia de mutaciones en la subunidad

de la RNAP. El plásmido pAIG307 (*bfpA-cat + perA*) en presencia de cada uno de los plásmidos que portan las mutantes en la subunidad σ^{70} RNAP (Figura 13). Se observa que, excepto la mutante -EA574, ninguna de las mutantes redujo la

actividad en más del 30%, la mayoría presentaron una actividad incrementada entre 10 y 60%, esto considerando que una reducción menor o igual a 30% indica una afectación significativa de la activación transcripcional, como se ha observado con otros reguladores (Olekhovich y Kadner, 1999; Holcroft y Egan, 2000a; Bhende y Egan, 2000; Grainger *et al.* 2004). Este resultado llama la atención, por el hecho de no esperar interacciones entre la subunidad RNAP y PerA durante la activación de *bfpA*.

Expresión de la fusión *perA-cat* en presencia de mutaciones en la subunidad

de la RNAP. El plásmido pYML-PerA (*perA-cat* + *perA*) en presencia de cada uno de los plásmidos con las mutantes en la subunidad RNAP (Figura 14). Se advierte que las mutantes -EA574, -IA590, -EA591, -RA596 y -KA597 reducen la expresión de *perA-cat* en 60% o más. Si se considera el número de copias de cada una de las mutantes, entonces se podría interpretar este comportamiento como anómalo, durante la activación de la fusión transcripcional; sin embargo, también podemos señalar que estos residuos probablemente participen en la interacción con la proteína PerA durante la activación de su propio promotor.

Expresión de la fusión *bfpA-cat* en presencia de mutaciones en la subunidad

de la RNAP. pAIG307 (*bfpA-cat* + *perA*) en presencia de cada uno de los plásmidos con las mutantes en la subunidad RNAP (Figura 15). Se observa que las mutantes -E261A, -L262A, -T263A, -R265A, -C269A, -K271A, -E273A, -H276A y -P293A, disminuyen la expresión de *bfpA-cat* en más del 60%. Esto indica una posible interacción entre esta subunidad de la RNAP y el activador transcripcional PerA, durante la transcripción de la fusión *bfpA-cat*, de la forma como lo hacen los promotores de clase I.

Expresión de la fusión *perA-cat* en presencia de mutaciones en la subunidad

de la RNAP. pYML-PerA (*perA-cat* + *perA*) en presencia de cada uno de los plásmidos con las mutantes en la subunidad RNAP (Figura 16). Se aprecia un resultado inesperado, ya que las mutantes -R255A, -D258A, -L260A y -I275A presentan una actividad específica menor al 40%. Estimando las distancias que guardan en el sitio de pegado, entre los sitios -75 y -46, en la región reguladora de *perA* (Bustamante *et al.* 1998; Martínez-Laguna *et al.* 1999; Ibarra *et al.* 2003); se esperaba que PerA hiciera contacto con la subunidad de la RNAP. Pero este resultado lleva a pensar que la interacción podría darse con la subunidad de la RNAP, o bien con ambas subunidades, como ocurre en el caso de CRP (cAMP receptor protein) y SoxS (Wang *et al.*; 1998; Busby y Ebright, 1999; Martin *et al.* 2000; Martin *et al.*; 2002; Lawson *et al.*; 2004; Hudson *et al.*; 2009). Comportándose como un promotor de clase II, esto es, que el sitio de interacción del activador en el promotor le permite interactuar con ambas subunidades de la RNAP.

Dado que, algunas de las construcciones no fueron apropiadas para la evaluación mediante este tipo de ensayos de actividad CAT específica, se desarrolló una estrategia, consistente en ejecutar experimentos de expresión del transcrito de *bfpA* y de *perA* por medio de RT-PCR semicuantitativo. De ese grupo de mutantes, ninguna alteró la expresión de *bfpA* (Figura 17). En cambio, la expresión del transcrito de *perA* disminuyó considerablemente en presencia de las mutantes -K271A, -I278A, -T285A y -N294A (Figura 18). Por lo tanto, considerando los resultados anteriores, se decidió seleccionar las siguientes mutantes de las subunidades y de la RNAP, debido a que, probablemente sea un reflejo de la carencia de interacción entre alguna o ambas subunidades de la RNAP, por su incapacidad para activar la transcripción de los promotores *bfpA* y *perA*:

Subunidades de la RNAP seleccionadas por disminuir la activación de los promotores *bfpA*, *perA* o ambos.

RNAP con <i>bfpA</i>	RNAP con <i>bfpA</i>	RNAP con <i>perA</i>	RNAP con <i>perA</i>
-E261A	-EA574	-K271A	-EA574
-R265A		-I278A	-IA590
-E273A		-T285A	-EA591
-H276A		-N294A	-RA596
			-KA597

Tomando en cuenta todos estos resultados, faltaría por realizar pruebas de interacción entre las mutantes en la RNAP seleccionadas y las mutantes en PerA E116A y D168A, con la finalidad de determinar los residuos de aminoácidos específicos que participan en la interacción proteína-proteína durante la activación de *bfpA* y de *perA*, y así establecer que tipo de activador es PerA, si de clase I, clase II o ambidiestro durante la activación de los promotores mencionados.

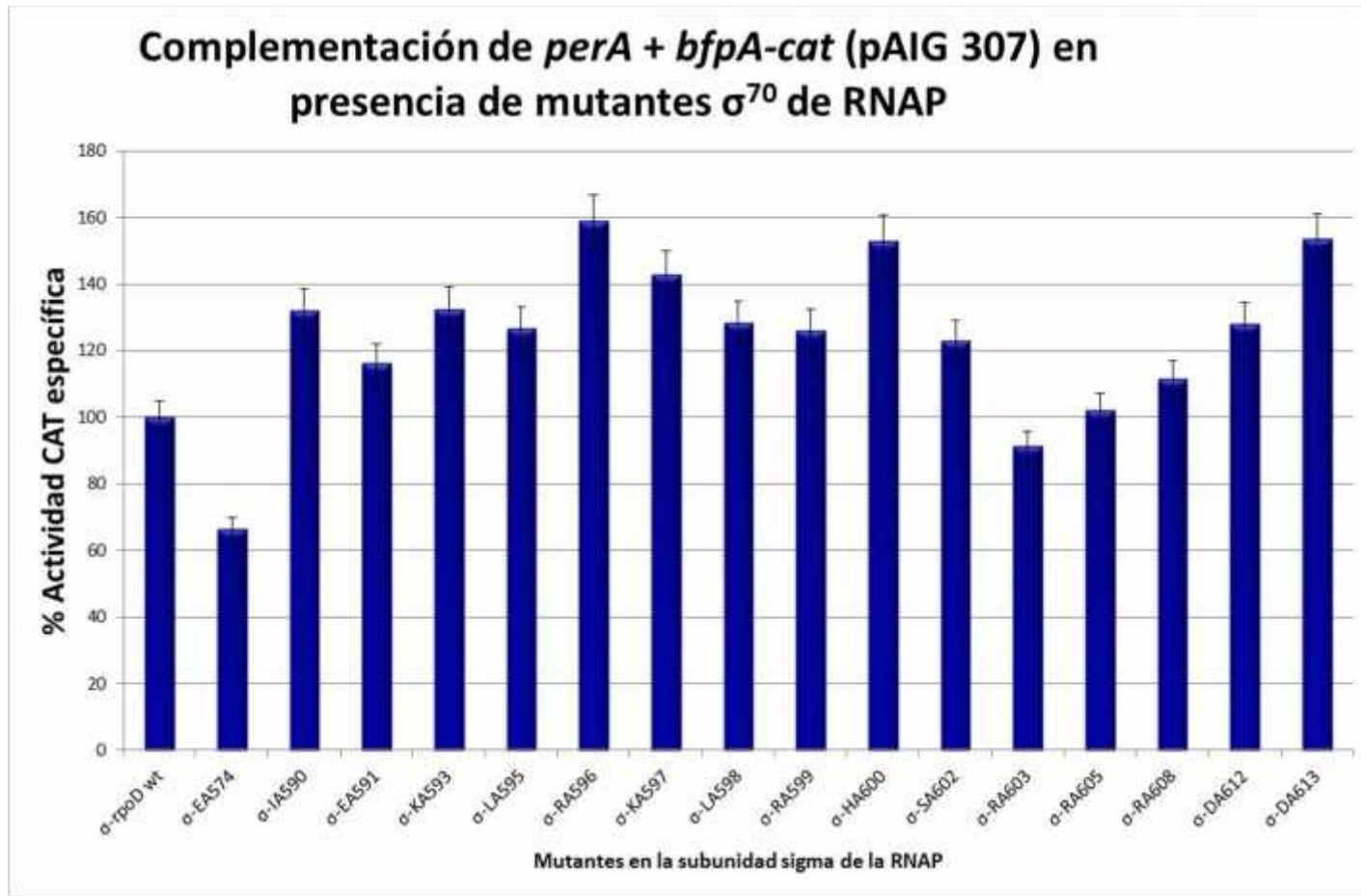


Figura 13. Efecto de mutaciones en la subunidad σ de la RNAP sobre la expresión de *bfpA* dependiente de PerA. Los ensayos se realizaron por triplicado mediante un precultivo a 37°C y DO₆₀₀ 1.0, lavado con PBS, con este se inoculó 30 ml de DMEM, se incubó a 37°C y la última muestra a DO₆₀₀ 1.2 se lavó con T-DTT, para su lectura de actividad CAT con 5 μ l más 200 μ l de reactivos (DNTB, H₂O, AcCoA, Cm) y de proteínas con 10 μ l más 200 μ l de reactivos (BCA protein assay kit). Los resultados se muestran \pm DT.

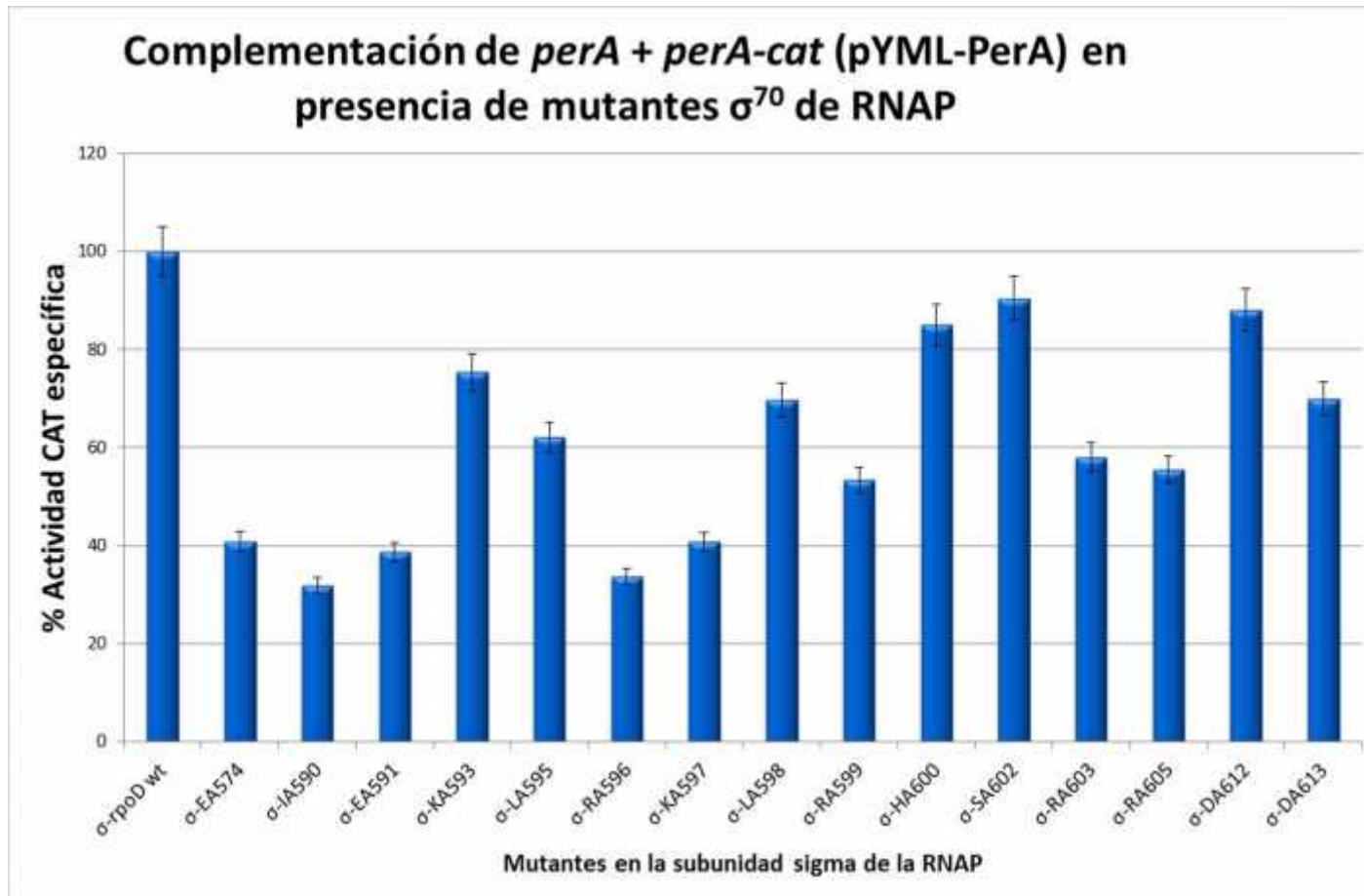


Figura 14. Efecto de mutaciones en la subunidad σ de la RNAP sobre la expresión de *perA* dependiente de PerA. Los ensayos se realizaron por triplicado mediante un precultivo a 37°C y DO₆₀₀ 1.0, lavado con PBS, con este se inoculó 30 ml de DMEM, se incubó a 37°C y la última muestra a DO₆₀₀ 1.2 se lavó con T-DTT, para su lectura de actividad CAT con 5 μ l más 200 μ l de reactivos (DNTB, H₂O, AcCoA, Cm) y de proteínas con 10 μ l más 200 μ l de reactivos (BCA protein assay kit). Los resultados se muestran \pm DT.

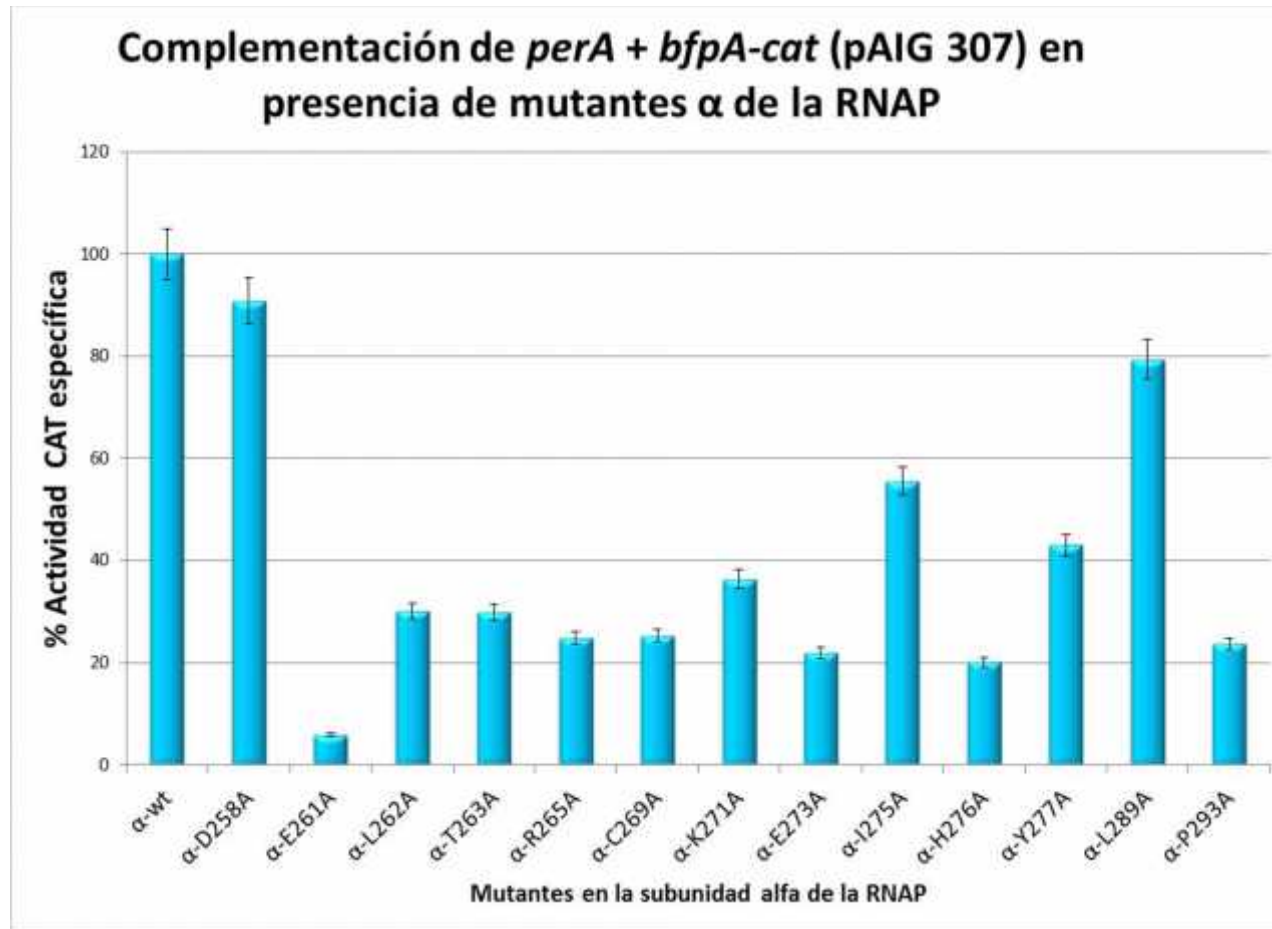


Figura 15. Efecto de mutaciones en la subunidad α de la RNAP sobre la expresión de *bfpA* dependiente de *PerA*. Los ensayos se realizaron por triplicado mediante un precultivo a 37°C y DO₆₀₀ 1.0, lavado con PBS, con este se inoculó 30 ml de DMEM, se incubó a 37°C y la última muestra a DO₆₀₀ 1.2 se lavó con T-DTT, para su lectura de actividad CAT con 5 μ l más 200 μ l de reactivos (DNTB, H₂O, AcCoA, Cm) y de proteínas con 10 μ l más 200 μ l de reactivos (BCA protein assay kit). Los resultados se muestran \pm DT.

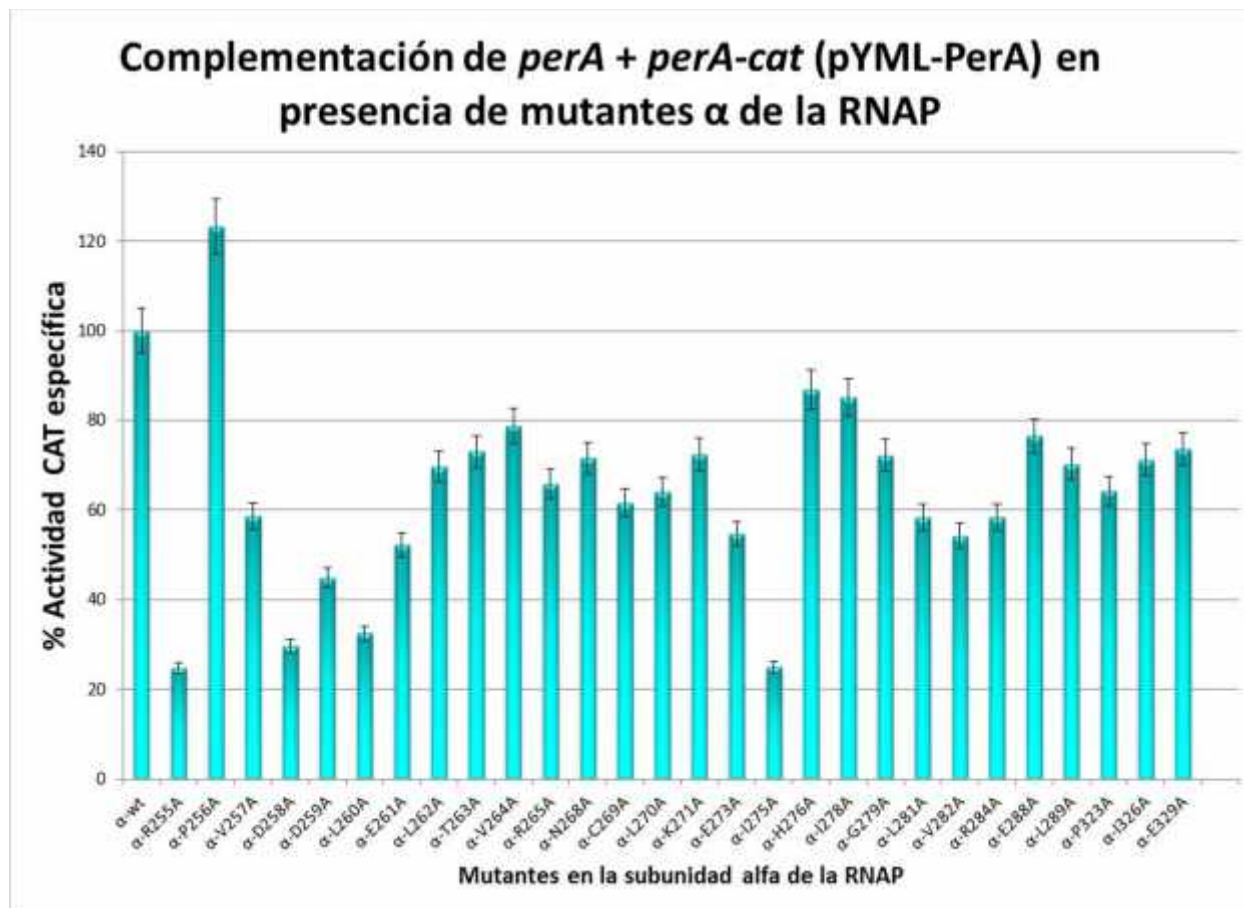


Figura 16. Efecto de mutaciones en la subunidad α de la RNAP sobre la expresión de *perA* dependiente de PerA. Los ensayos se realizaron por triplicado mediante un precultivo a 37°C y DO₆₀₀ 1.0, lavado con PBS, con este se inoculó 30 ml de DMEM, se incubó a 37°C y la última muestra a DO₆₀₀ 1.2 se lavó con T-DTT, para su lectura de actividad CAT con 5 μ l más 200 μ l de reactivos (DNTB, H₂O, AcCoA, Cm) y de proteínas con 10 μ l más 200 μ l de reactivos (BCA protein assay kit). Los resultados se muestran \pm DT.

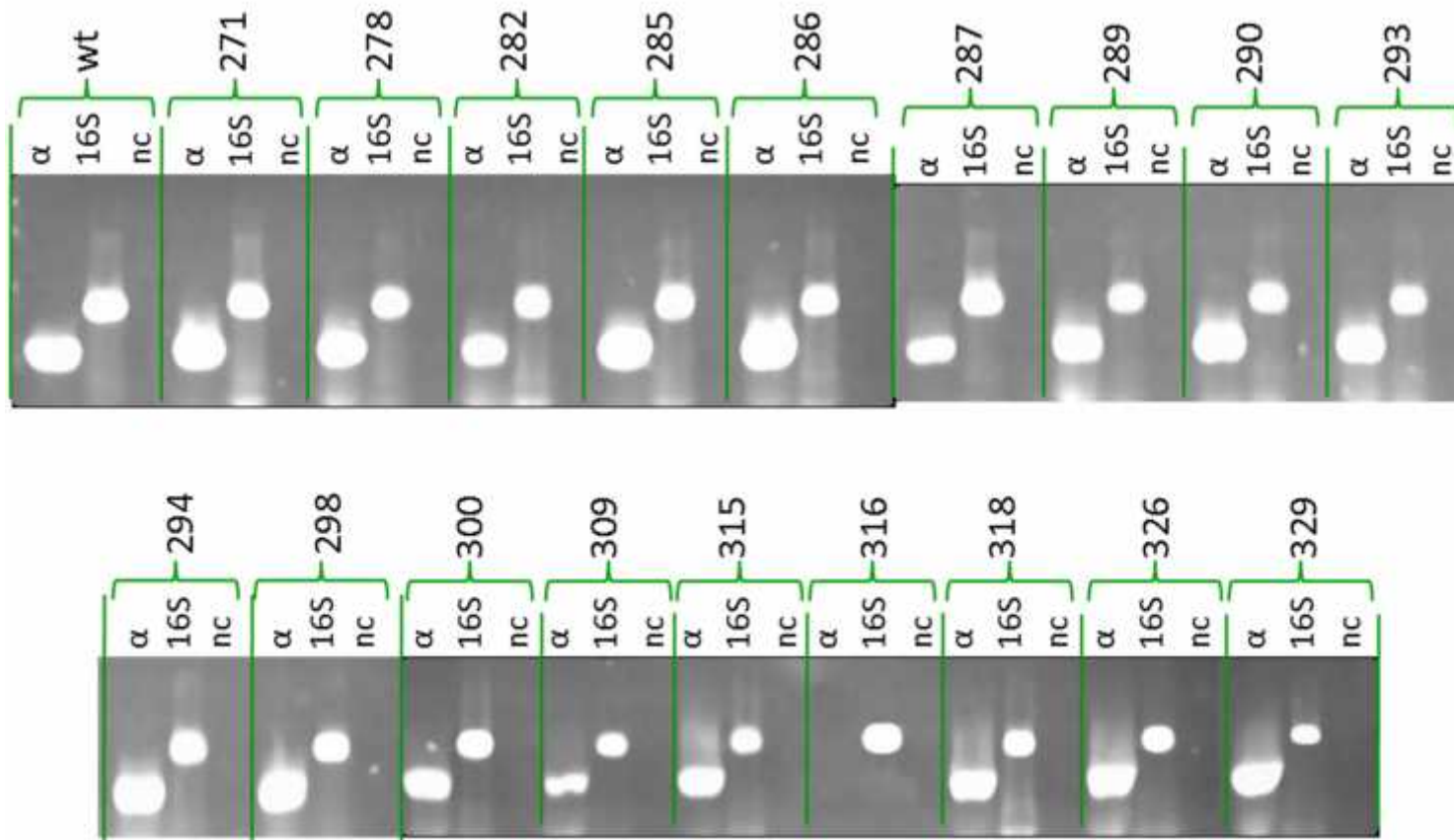


Figura 17. Expresión del transcrito de *bfpA* en presencia mutantes de la subunidad α de la RNAP por RT-PCR semicuantitativo. El ensayo se realizó en fondo EPEC por medio de un estuche de reactivos "Titan one tube" RT-PCR, en un solo paso bajo las siguientes condiciones: Transcripción reversa 50°C 30 min; desnaturalización inicial 94°C 2 min; amplificación 1 94°C 30 seg, 54-57°C 30 seg, 68°C 45 seg; amplificación 2 94°C 30 seg, 54-57°C 30 seg, 68°C 4 min; alargamiento final 68°C 7 min. α - subunidad alpha de la RNAP; 16S – estándar interno del 16S del RNA ribosomal como control positivo; nc – control negativo. Los números representan el residuo mutado.

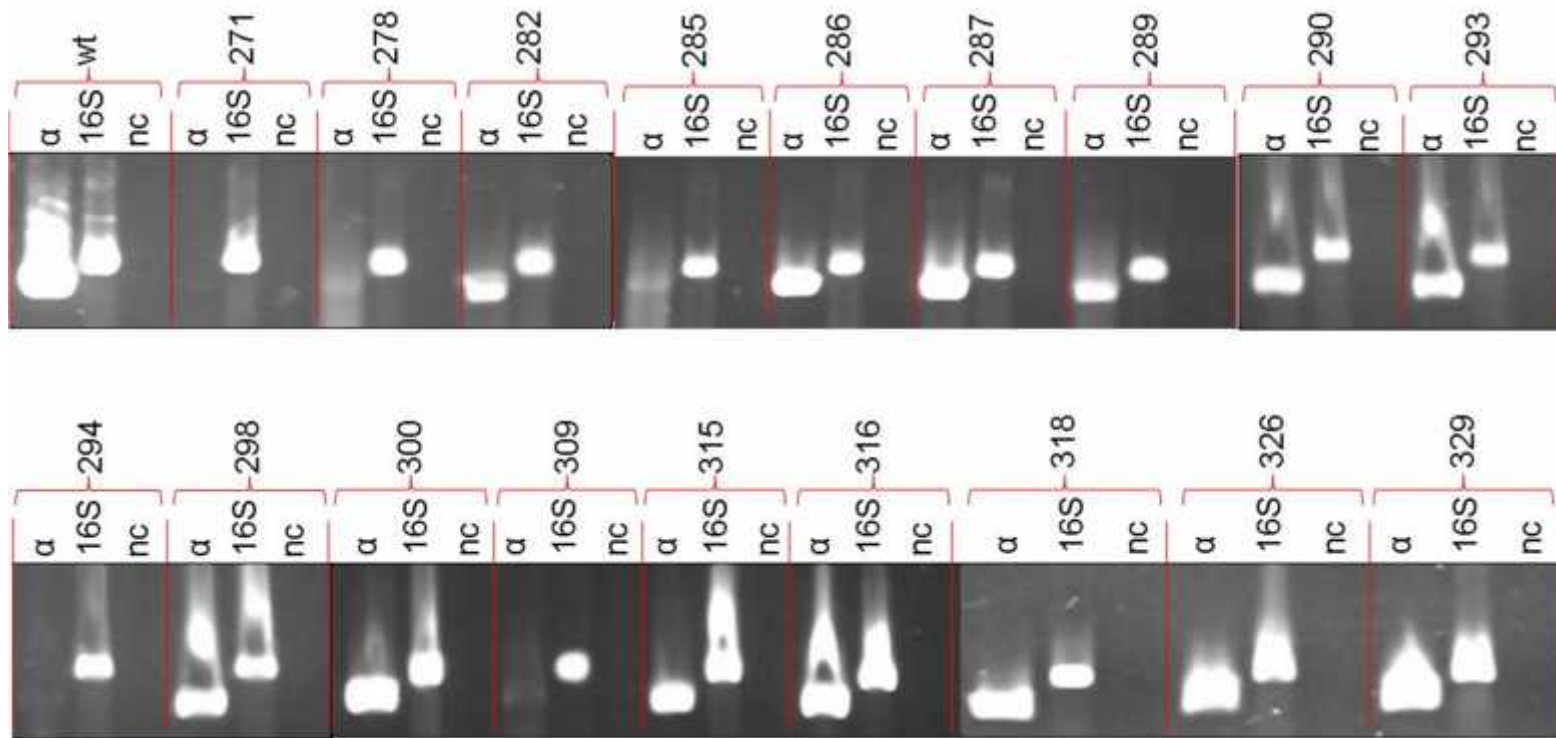


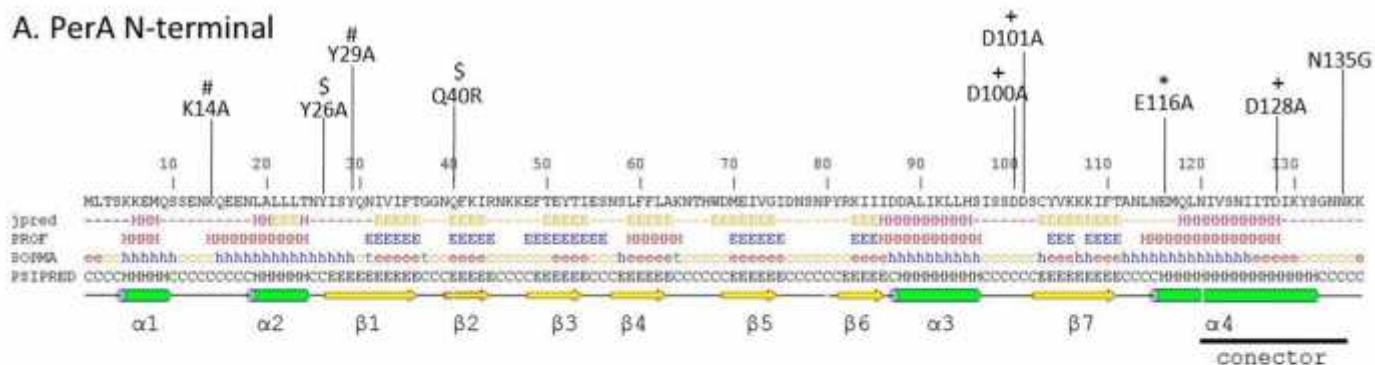
Figura 18. Expresión del transcrito de *perA* en presencia mutantes de la subunidad α de la RNAP por RT-PCR semicuantitativo. El ensayo se realizó en fondo EPEC por medio de un estuche de reactivos "Titan one tube" RT-PCR, en un solo paso bajo las siguientes condiciones: Transcripción reversa 50°C 30 min; desnaturalización inicial 94°C 2 min; amplificación 1 94°C 30 seg, 54-57°C 30 seg, 68°C 45 seg; amplificación 2 94°C 30 seg, 54-57°C 30 seg, 68°C 4 min; alargamiento final 68°C 7 min. α - subunidad alpha de la RNAP; 16S - estándar interno del 16S del RNA ribosomal como control positivo; nc - control negativo. Los números representan el residuo mutado.

Para sugerir o proponer un posible efecto de la modificación de los residuos sobre el comportamiento estructural, se planteó la predicción de estructura secundaria de PerA, de ambos dominios, amino y carboxilo terminales, en cuatro diferentes programas (jpred, PROF, SOPMA y PSIPRED), que predicen un consenso satisfactorio de las características dentro de cada dominio (Figura 19). En la imagen podemos observar que el dominio N terminal, consiste de dos α -hélices (aa 5-24) en la porción inicial, seguido de una región de aproximadamente 6 láminas β (aa 27-86) y después una región de dos α -hélices con una lámina entre las dos (aa 103-111). Asimismo, el dominio C terminal, consiste de una región con estructura de β -hélice (aa 139-266), con aproximadamente 8 α -hélices.

En la predicción de las estructuras de las mutantes E116A y D168A en PerA, se aprecia que los cambios son notables en la primera porción del dominio N terminal, no importado la ubicación de los residuos modificados; formándose una gran región α -hélice unida a una porción de siete láminas β , en el caso de E116A le siguen tres α -hélices y en D168A sólo dos; los dominios C terminales permanecen sin cambios en la estructura. Esto se repitió con la mayoría de las mutaciones, excepto K14A que inicia con 2 α -hélices seguida por 7 láminas β con una α -hélice intercalada entre las dos últimas láminas β ; Y29A presenta 2 α -hélices, seguidas por 8 láminas β con una pequeña α -hélice intercalada entre las dos primeras láminas β ; y finalmente D100A, es la que más difiere puesto que inicia con una lámina β seguida de un α -hélice y después 7 láminas β (Apéndice IV).

También se efectuó un modelo tridimensional, utilizando el servidor de modelado de homología de proteínas CPHmodels 3.0 (Lund *et al.* 2002; Nielsen *et al.* 2010), que nos ayuda a predecir la orientación de los residuos mutados en el extremo carboxilo terminal de la proteína PerA (Ibarra *et al.* 2013) (Figura 20 y Apéndice II).

A. PerA N-terminal



B. PerA C-terminal

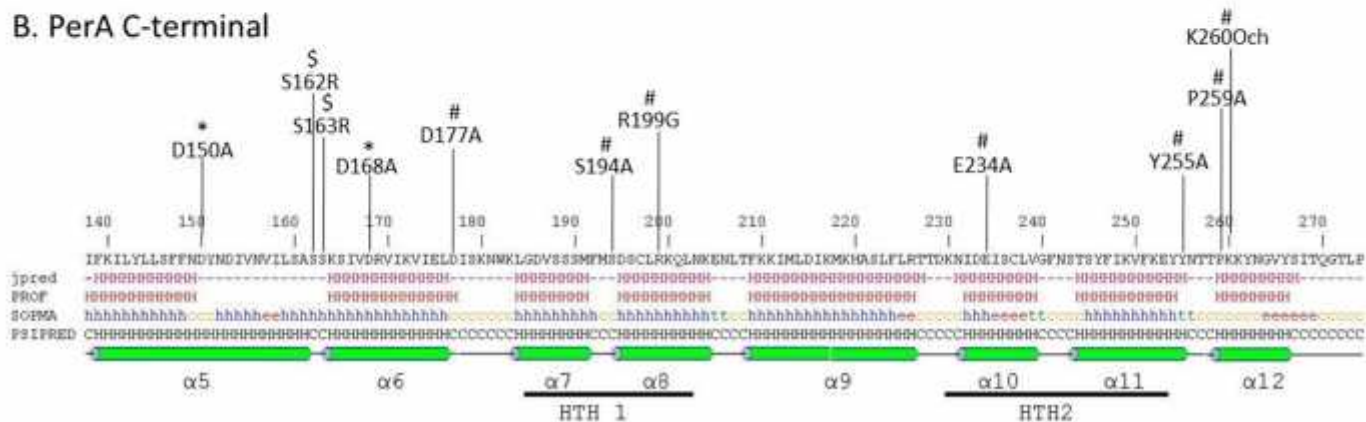


Figura 19. Predicción de la estructura secundaria de PerA y resumen de los efectos de las mutaciones en cada dominio. Muestran <30% de la actividad de *per-cat* y *bfpA-cat* (#), <30% *per-cat* o *bfpA-cat* (*), >100% *per-cat* y *bfpA-cat* (\$), >100% *per-cat* o *bfpA-cat* (+).

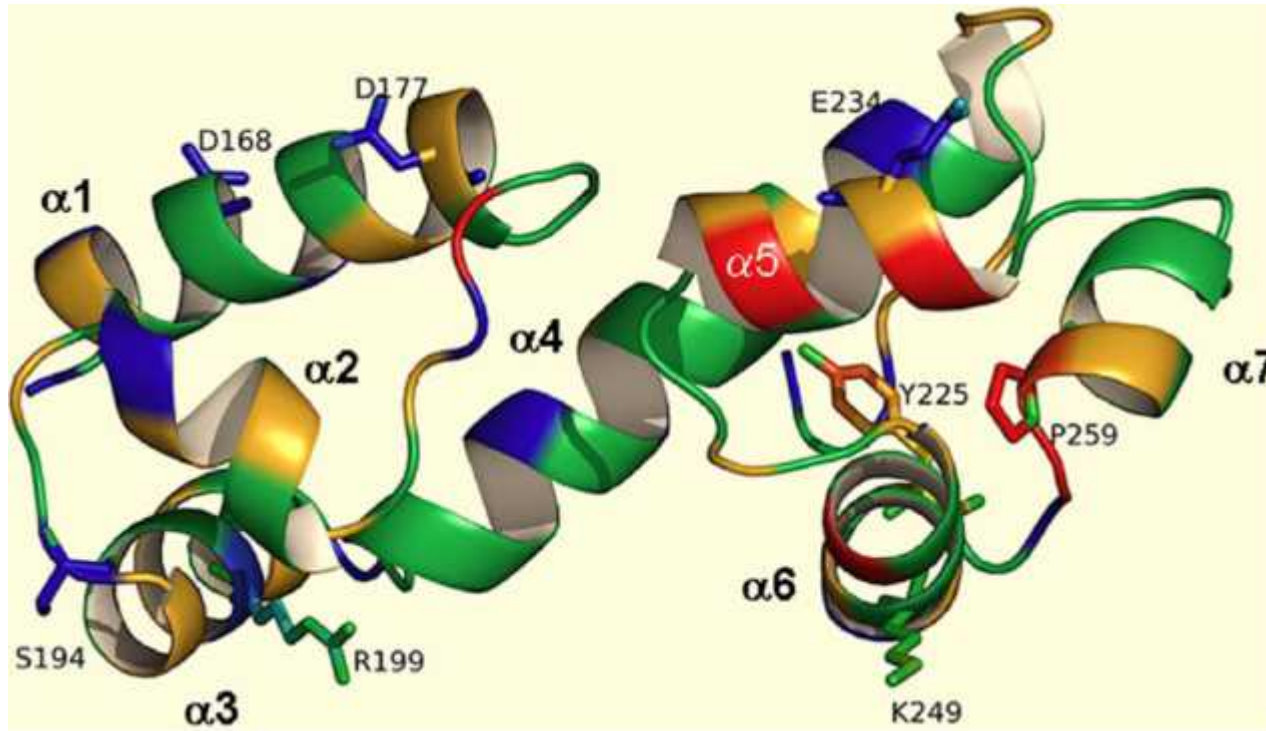


Figura 20. Mapeo de mutaciones en PerA CTD. Modelo tipo cinta de la estructura terciaria molecular predicha del CTD de PerA, incluyendo el dominio de unión a DNA HTH obtenido con CPHmodels 3.0 y utilizando la estructura del regulador transcripcional Rob como molde. El extremo CTD está compuesto de siete α -hélices ($\alpha 1$ a $\alpha 7$) comprendiendo dos motivos HTH ($\alpha 2$ -curva- $\alpha 3$ para HTH1 y $\alpha 5$ -curva- $\alpha 6$ para HTH2) conectados vía una estructura conector α -hélice ($\alpha 4$) y dos α -hélices flanqueantes ($\alpha 1$ y $\alpha 7$). Los residuos mutados D168, D177, S194, R199, Y225, E234, K249 y P259 se indican y destacan como estructuras tipo bastón o barras. La hélices alfa (α) corresponden a las mostradas en la figura 6 de este capítulo. Figura tomada de Ibarra *et al.* 2013.

X. DISCUSIÓN

Todos los procesos celulares bacterianos tales como el crecimiento, desarrollo, morfogénesis y la diferenciación celular son el producto de diversos programas de expresión génica que involucran la regulación transcripcional de varios genes. El componente central en la regulación transcripcional en las bacterias es el complejo RNA polimerasa (RNAP), responsable de la transcripción, la cual interactúa con el promotor en el DNA para formar un complejo de inicio cerrado. Posteriormente, alrededor del sitio de inicio de la transcripción formar un complejo abierto y comenzar la síntesis de RNA. Este proceso de regulación transcripcional está estrictamente controlado y coordinado por proteínas llamadas reguladores transcripcionales, estos reguladores transcripcionales son proteínas de unión a DNA que se unen al promotor y facilitan la represión o la activación de la transcripción.

Las proteínas reguladoras represoras y activadoras trabajan en vías opuestas. Los represores se unen a un operador y apagan el promotor evitando la transcripción de los genes dependientes de tal promotor. Los activadores se unen en sitios activadores y encienden el promotor permitiendo la transcripción de los genes del operón. En contraste, el activador y el represor pueden unirse en diferentes zonas del DNA, los activadores corriente arriba de la secuencia -35 del promotor pueden tener contacto con la RNAP unida al promotor; los represores se unen a la región promotora o muy cerca, y bloquean el acceso al promotor por la RNAP (Busby y Ebright, 1994).

Aunque algunos activadores transcripcionales bacterianos funcionan por mecanismos más complejos, muchos activadores simplemente hacen contacto directo con la RNAP reclutándola al promotor blanco (Lee *et al.* 2012). El contacto directo entre el activador y la RNAP compensa posibles defectos en la interacción entre RNAP y DNA promotor. Esto se muestra claramente, en los promotores

dependientes de activador clase I, donde el activador se une al blanco localizado corriente arriba del promotor y haciendo contacto con la subunidad CTD, reclutando al resto de la RNAP, al promotor (Zhou *et al.* 2014).

Un activador puede aumentar la transcripción asistiendo a la formación de la holoenzima de la RNAP, operando como un coactivador o estimulando la transcripción de los genes próximos. Un activador esencialmente incorpora a la RNAP a su región promotora, uniéndose en el sitio de unión del activador que sirve de enlace entre la RNAP y el DNA. Sin embargo, se ha propuesto un mecanismo alternativo para los reguladores MarA y SoxS, éstos interactúan con la RNAP libre antes de unirse al promotor DNA, lo que se conoce como pre-reclutamiento (Griffith *et al.* 2002). Algunas veces, el activador se necesita para que la RNAP cambie la conformación del DNA a través de alosterismo para iniciar la transcripción.

La RNAP por si sola no forma el complejo abierto, necesita de un activador (Martin *et al.* 2002; Browning y Busby, 2004). El inicio de la transcripción involucra la conversión de la formación del complejo cerrado, entre la RNAP y el DNA promotor, al complejo abierto. El complejo permanece cerrado hasta que ocurre una remodelación dependiente de hidrólisis de ATP por un activador, éste se une a secuencias tipo “enhancer” corriente arriba del sitio promotor. Esta remodelación facilita la fusión del DNA y permite la transición al complejo abierto (Bose *et al.* 2008).

El sello distintivo de la infección por EPEC es la lesión histopatológica de A/E. Esta lesión comienza con la adherencia localizada mediada por los Bfp, que son activados transcripcionalmente por PerA, que a su vez se autoactiva. Por lo que, de comprender la regulación transcripcional de estos sistemas de activación e interacción entre la RNAP y PerA durante la transcripción, se podrán desarrollar herramientas moleculares que eviten la instalación del proceso patológico en el

epitelio intestinal y así evitar el mecanismo de la diarrea resultante de la infección por EPEC.

RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS EN PORCIONES INICIALES DE LOS DOMINIOS N Y C QUE PROBABLEMENTE ESTÁN INVOLUCRADOS EN LA UNIÓN A DNA EN LA REGIÓN REGULADORA DE *bfpA*, *perA* O AMBOS.

En otras proteínas de la familia AraC/XylS, se ha observado que el dominio amino terminal reduce la autoasociación del dominio de dimerización de AraC (Weldon y Schleif, 2006), y, participa en la unión del ligando y en la dimerización, como es el caso de AraC (Soisson *et al.* 1997), XylS a través de los residuos de Leucina 193 y 194 (Ruíz *et al.* 2003), RhaS (Bhende y Egan, 2000). Aunque en el caso de PerA no existe la unión a un ligando y actúa como monómero (Ibarra *et al.* 2003), podría, como en el caso de Rns (Mahon *et al.* 2010; Basturea *et al.* 2008), ser esencial para la regulación transcripcional, la autorregulación y la unión al DNA.

El análisis de la actividad de mutantes del activador transcripcional PerA en los residuos Y29, D150 y D177 indica que estos están involucrados en la unión a secuencias de DNA en el promotor de *bfpA* y de *perA*. Esto debido a que estas mutaciones disminuyen la actividad de las fusiones transcripcionales *bfpA-cat* y *perA-cat*. Y29 y D177 prácticamente anulan ambas actividades, D150 disminuye la actividad de *bfpA-cat* en más del 50% y la de *perA-cat* en 80%, sugiriendo que la incapacidad de activar la transcripción de los promotores mencionados, cuando estos residuos se cambian por alanina, se debe a la falta de reconocimiento del sitio promotor. Al observar la figura 19, se aprecia que el residuo Y29 se encuentra ubicado en la lámina α_1 del dominio N terminal, D150 se encuentra a la mitad de la primera α -hélice del dominio C terminal y D177 se ubica en una espiral enrollada

entre las α -hélices 2 y 3 del dominio C terminal (6 y 7 en la figura). Estas ubicaciones pueden señalar pequeños ajustes en la conformación de la proteína que durante la activación impiden que estos residuos se ubiquen en los sitios promotores correspondientes *bfpA* o *perA*, o bien debiliten su unión al DNA, por encontrarse alterada. Estos pequeños cambios de configuración se aprecian en la estructura secundaria del dominio N terminal, siendo más notable para PerA Y29 (Apéndice IV).

Esta falta de unión a los promotores blanco se corroboró por los ensayos de cambio en la movilidad electroforética (Figura 10E). Sin embargo, mencionamos que PerA D150 es capaz de activar parcialmente la transcripción de los promotores, principalmente de *bfpA*. Esto probablemente se deba a que la mutación favorece que algún residuo adyacente se coloque sobre el DNA promotor, en forma suficientemente estable para permitir la transcripción, por lo que, quedaría por identificar cual es el residuo involucrado en la activación parcial o bien, si ese o esos residuos activan por completo la transcripción de los promotores mencionados y posteriormente ver si se unen al DNA. Otra posibilidad sería la participación de un coactivador que contribuye a la unión de la RNAP al promotor, activando la transcripción a través de interacciones proteína-proteína, o bien, modificando la del DNA, respecto a esto habría que identificar el coativador y su participación.

En contraste, la sobreexpresión de la fusión transcripcional *perA-cat* con la mutación PerA D101A en más del 25%, probablemente se relacione con el número de copias de los plásmidos pUST166 y pK3 mut PerA (Figura 8), o que manifieste una conformación más estable durante el reconocimiento. Estos datos indican que este residuo de aminoácido no está comprometido con el reconocimiento de la región promotora ni con la unión a DNA.

ACTIVACIÓN DIFERENCIAL DE LOS PROMOTORES P_{perA} Y P_{bfpA} POR MUTANTES DE PerA

En cuanto al residuo E234, localizado en la sexta α -hélice del dominio C terminal (10 en la figura 18), se cree que está expuesto en la superficie del lado opuesto del motivo HTH2 (Porter *et al.* 2004). La posición de este residuo es altamente conservada entre otros miembros de la familia AraC/XylS y corresponde al ácido aspártico, presente en SoxS (D75), en RhaS (D241), en MelR (D261) y en VirF (D227) (Apéndice I). Se ha demostrado que estos residuos probablemente interaccionen con la subunidad σ^{70} de la RNAP (Bhende y Egan, 2000; Griffith y Wolf, 2002; Grainger *et al.* 2004a). Aunque Porter y colaboradores, encontraron una disminución parcial en la actividad de E234 con ambos promotores (Porter *et al.* 2004), en este estudio se puede apreciar que el residuo disminuye drásticamente la activación transcripcional de ambas fusiones *bfpA-cat* y *perA-cat*, lo que corroboraría que los residuos ubicados en el motivo HTH2 participan en la unión a DNA (Niland *et al.* 1996; Gallegos *et al.* 1997; Rhee *et al.* 1998; Bhende y Egan, 1999; Griffith y Wolf, 2002; Porter y Dorman, 2002; Grainger *et al.* 2003; Childers *et al.* 2007; Domínguez-Cuevas *et al.* 2008a y b). Sin embargo, se comprobó que esa disminución no se debe a la falta de reconocimiento de las regiones promotoras, puesto que en la figura 10D se observa la unión a las regiones reguladoras, tanto de *bfpA* como de *perA*; entonces, esta falta de actividad se debe a que este residuo pudiera, por un lado estar involucrado con el reconocimiento de la maquinaria de transcripción, algo que se ha mencionado también para el caso de este motivo, por ser altamente conservado, en VirF y Rns (Porter *et al.* 2004). Por otro lado, inducir una menor curvatura del DNA, impidiendo la formación de otras interacciones proteína-proteína, lo que por lo tanto impide activar la transcripción, como ocurre con la mutación H213Y de AraC, R71A de la proteína FIS y la forma mutante de la proteína del fago ϕ 29 P4 (Mencia *et al.* 1996; Bokal *et al.* 1997; Saviola *et al.* 1998a); faltaría por deducir si

interactúa con alguna de las subunidades de la RNAP, considerando que es un residuo, que se prevé estar orientado lejos del DNA, basado en la estructura de MarA, pero es el equivalente a D241 en el activador RhaS, del cual se ha sugerido media contactos con la subunidad ⁷⁰ de la RNAP (Bhende y Egan, 2000; Porter *et al.* 2004).

En esta investigación se obtuvieron resultados muy interesantes con dos de las mutaciones, un cambio de residuo E116A ubicado en la porción final del dominio N terminal, en la cuarta α -hélice, próxima a la región conectora, (Figura 19), y otro cambio D168A en la parte inicial del dominio C terminal, en la segunda α -hélice cercana al motivo HTH1 (Figura 19), en una zona de probable unión con la RNAP (Gallegos *et al.* 1997), (Figura 7A y Apéndice I).

Se puede observar que la mutante con cambio en el residuo E116, demuestra una capacidad diferencial al activar los promotores *bfpA* y *perA*. Esto porque no alteró la actividad transcripcional de la fusión *bfpA-cat*, que fue de 96%, lo que indica que dicho residuo de aminoácido no está involucrado en el reconocimiento del promotor del operón *bfp*. Sin embargo la actividad de *perA-cat* cayó drásticamente a 4.7% (Figura 8), esto podría deberse a una falta de identificación de la región promotora de *perA* (Martin *et al.* 2000). No obstante, cuando se realizaron los ensayos de retardo en gel para ver la formación del complejo DNA-proteína y corroborar si la no actividad se debía a la falta de unión con el promotor *perA*, se pudo apreciar que la proteína PerA con la mutación en el residuo E116, no solo se une al promotor *bfpA* sino también a *perA*, y con una mayor afinidad que con la proteína PerA silvestre (Figura 10B). Probablemente, porque la conformación de la cadena lateral que adquiere le permite una mejor unión a su promotor. De forma similar, se encontró un residuo de ácido glutámico (E89) en MarA que al ser reemplazado por alanina incrementa la unión y la activación de promotores de clase I (Martin y Rosner, 2011). Estos datos sugieren entonces que la falta de actividad no se debe a la no unión al DNA promotor de *perA*, por lo que es probable que ese residuo participe en la interacción con la

RNAP durante la activación de este promotor. Este resultado propone que para la activación de su propio promotor, PerA probablemente interactúe con la RNAP, por lo que ahora es preciso determinar si se relaciona con alguna de las subunidades de la RNAP.

De igual forma, la mutación en el residuo D168 provoca una diferencia en la capacidad de activar a uno u otro promotor. Si bien la activación de *bfpA-cat* fue de 76.15%, próxima a la de PerA silvestre, la activación de *perA-cat* fue de 27.79%, que, aunque no es tan reducida como E116A, si es significativa con relación a PerA silvestre (Figura 8). Esto indica que el residuo D168 no participa en la unión al promotor *bfpA* y de acuerdo con los ensayos de unión (Figura 10C), tampoco participa en el reconocimiento de *perA*. Al tener una afinidad similar a la proteína silvestre, es posible que sea un residuo importante para que PerA interactúe con la RNAP en la activación de su propio promotor. Faltaría definir la subunidad de la RNAP con la que se vincula y establecer que tipo de activador transcripcional es PerA.

Si bien, de acuerdo con Martin *y cols.*, (Martin *et al.* 2000), la “discriminación” es la capacidad de un promotor de responder diferencialmente a los activadores; también la podríamos considerar como la capacidad de un regulador transcripcional de activar diferentes promotores, puesto que distingue un promotor de otro para activarlo.

Considerando estos resultados, se puede decir que las mutantes PerA E116 y PerA D168 activan diferencialmente a los promotores *bfpA* y *perA*, conduciendo a un nivel adicional de control. Tres posibles explicaciones son: i) que estos residuos estén involucrados y, presenten una afinidad reducida por la región promotora del operón *perA*, de forma similar a como ocurre con el residuo E89 de MarA (Martin y Rosner, 2011), lo que se descartó mediante los ensayos de retardo en gel, observando que ambos residuos conservan su capacidad de unión tanto a *bfpA* como a *perA* (Figuras 10B y 10C); ii) que la región promotora de *perA*

esté orientada de tal forma que permite el posicionamiento, de la porción final del extremo N terminal (E116) o de la fracción inicial del C terminal (D168) de PerA, favoreciendo una interacción con la RNAP, como sucede con MarA (Rhee *et al.* 1998), lo que faltaría por identificar y determinar si influyen en el comportamiento de PerA, como activador de clase I o II; ó iii) considerar la posibilidad de un impedimento estérico entre el promotor *perA* y PerA, donde cualquiera de las mutantes (E116 ó D168) reduzcan la activación por PerA, o bien, que las mismas, favorezcan un cambio conformacional que le permita a PerA interactuar con la RNAP. Es importante señalar que estos residuos en otras proteínas de la familia AraC/XylS no se han estudiado.

LAS CONDICIONES AMBIENTALES REGULAN LA TRANSCRIPCIÓN DE *perA* Y DE *bfpA*

Las bacterias reaccionan a diferentes condiciones ambientales utilizando distintos modos de modulación, una de ellas es la regulación transcripcional. Sus genes están organizados en una red jerárquica de regulones interconectados, dispuestos de forma flexible de acuerdo a las condiciones ambientales a que se enfrenta.

Es por ello que se decidió probar la capacidad de activación de las proteínas PerA mutantes con las fusiones transcripcionales *bfpA-cat* y *perA-cat* bajo diferentes condiciones ambientales, como temperatura a 37°C y a 40°C y concentración de amonio a 20 mM, una concentración que no afecta el crecimiento del organismo (Puente *et al.* 1996).

La actividad transcripcional de la fusión *bfpA-cat* a 37°C, con las mutantes PerA D100, PerA D101, PerA E116 y PerA D168 se mantuvo similar a PerA silvestre, y con la mutante PerA E234 se redujo en aproximadamente un 95%. En

cambio a 40°C, la actividad disminuyó considerablemente con las cinco mutantes, lo que sugiere que estos residuos son sensibles al incremento de temperatura durante la activación de *bfpA*, e incapaces de producir los Bfp y por lo tanto inhábiles para colonizar. En cuanto a la presencia de amonio, la actividad de *bfpA* también se redujo con las cinco mutantes, esto es, o son sensibles a la presencia de amonio en el medio, o bien esta concentración es tóxica por someterlas a un alto consumo de energía para su difusión (Figura 11) (von Wirén y Merrick, 2004).

Es importante señalar que, Amt es una familia de proteínas transportadoras de amonio, invariablemente asociada a GlnK, proteína de transducción de señal, perteneciente a la familia de proteínas P_{II}, las cuales actúan como transductores del nitrógeno celular en procariotes. GlnK se une a la membrana de forma dependiente de AmtB. Esta interacción es dependiente del nivel de nitrógeno en la célula, siendo máxima en condiciones de nitrógeno elevado. Esta asociación inhibe la actividad de AmtB y el amonio ya no es transportado al interior de la célula hasta que el nivel de amonio desciende (von Wirén y Merrick, 2004).

Probablemente la presencia de cualquiera de estas mutantes, impida la asociación entre AmtB y GlnK, de tal forma que el amonio es transportado al interior de la célula, concentración que puede ser tóxica, favoreciendo la disipación del gradiente de protones a través de la membrana, la acidificación del medio externo en respuesta a la absorción de amonio o un desbalance en el equilibrio ácido-base (von Wirén y Merrick, 2004).

Los resultados de la actividad transcripcional de *perA-cat* fueron más drásticos con las mutantes arriba mencionadas (Figura 12). Es así que, respecto a la temperatura a 37°C, las mutantes en PerA E116, D168 y E234 presentaron una actividad reducida en más del 75% y, la actividad de PerA D100 fue similar a la de PerA silvestre. En cultivos a 40°C, las mutantes PerA E116 y D168 muestran una actividad de la fusión transcripcional de 50%, comparado con PerA silvestre. PerA D100 se comporta de forma similar a PerA silvestre. Sin embargo, la mutante PerA

D101 presentó una actividad transcripcional de 150% a 37°C y a 40°C aumentó su actividad a 200%. De acuerdo con Hermann J. Muller este es un fenotipo hiperomorfo (en Prelich, 2012) que le permite a EPEC sobrevivir a estas temperaturas, al mismo tiempo, que este escape de la regulación probablemente se debe a que interactúa con algún regulador global y ambos tengan un efecto aditivo, de forma similar a como ocurre entre CodY y BCCA, y entre Lrp y PapI (Calvo y Matthews, 1994; Shivers y Sonenshein, 2004). La variación en fase de Pap, pili asociado a pielonefritis (Pap, “pyelonephritis-associated pili”), está controlada por la unión de la proteína reguladora de respuesta a leucina (Lrp, “leucine-responsive regulatory protein”), a dos regiones reguladoras *pap*. Pap varía entre un estado activo e inactivo transcripcionalmente. En ausencia de PapI, Lrp se une en sitios que se sobrepone al promotor *papAB* e inhibe la transcripción. La adición de PapI, resulta en la unión de Lrp en un sitio localizado 100 pb corriente arriba, encendiendo la transcripción (Kaltenbach *et al.* 1995).

Sin embargo, considerando que la regulación por múltiples factores de transcripción, ocurre en el 49% de los genes, también puede ocurrir una co-regulación entre un regulador global y reguladores locales específicos (Martínez-Antonio y Collado-Vides, 2003), como en el caso del gene *melAB*, co-regulado por CRP y MelR (Wade *et al.* 2001). La actividad de la mutante PerA E234, fue nula en cultivos a 40°C y en presencia de amonio. Por lo que se concluye que estas mutantes pueden favorecer la interacción con uno o más co-reguladores, locales o globales.

Si observamos los resultados de actividad Cat ante la presencia de amonio, fueron llamativos, puesto que las cuatro mutantes en PerA (D100, D101, E116, D168) mostraron actividad transcripcional incrementada considerablemente, comparado con PerA silvestre, D100 en 20%, D101 en 30%, E116 y D168 en 25%. Esto es, fueron más resistentes a la concentración de amonio en 20 mM, esto es, la asociación entre AmtB y GlnK, se vio favorecida. Se sabe que el amonio reduce la expresión de *bfp* y de *per* (Puente *et al.* 1996; Martínez-Laguna

et al. 1999), aquí estas mutantes evadieron la regulación por amonio, lo que es un resultado comparable al que se encontró con la mutación E89A en MarA, donde un cambio menor en un sólo aminoácido, puede influenciar fuertemente la actividad, a pesar de que esté involucrado en interacción positiva con el DNA o con la RNAP, haciéndola más resistente a estrés por antibióticos que MarA silvestre (Martin y Rosner, 2011). Una actividad transcripcional incrementada en estas mutantes, podría significar que el cambio de residuo generó una conformación de la proteína que la hace más resistente en presencia de amonio, impidiendo que se vean afectados los residuos en interacción con el promotor o con la RNAP, o bien que estos residuos interactúen con algún regulador local.

Aunque, por otro lado, Müller y cols., han demostrado que *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* son bacterias resistentes a elevadas concentraciones de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, hasta de 500 mM, y, que la deficiencia en el crecimiento se debe, más que al efecto específico del amonio, a un aumento en la osmolaridad o a un incremento en la fuerza iónica (Müller *et al.* 2006); entonces al observar la Figura 12, se puede decir que el regulador PerA de EPEC es susceptible a elevadas concentraciones de amonio, pero las cepas mutantes en D100, D101, E116 y D168 se muestran defectuosas en la simulación de amonio durante la transcripción de *perA*, si bien no llegan a los límites de expresión mostrados por S162R y S163R (datos del grupo de estudio, comentario personal), este resultado sugiere que estas mutantes pueden estar interactuando con algún regulador global de osmolaridad o con algún sistema de regulación de nitrógeno como Ntr, ppGpp, Lrp o cAMP (Reitzer, 2003); o bien, que la transcripción se active a partir de la interacción con ⁵⁴ (Burkovski, 2003), lo que permite que estas proteínas PerA mutantes se escapen de la regulación por amonio.

Los resultados demuestran que un pequeño cambio en un solo residuo en la cadena lateral, como es ácido glutámico o ácido aspártico por alanina, puede

influnciar fuertemente la actividad. A pesar de cualquier evidencia de que esta cadena esté involucrada en interacciones positivas con el DNA o con la RNAP.

LA SUBUNIDAD σ^{70} PARTICIPA EN LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL OPERÓN *perA* DEPENDIENTE DE PerA

El reconocimiento de residuos específicos en la RNAP y en una proteína es crítico para entender la expresión genética y la virulencia. La interacción proteína-RNAP puede resultar en la formación de una unión tipo guante-bolsillo entre ellas, pero el tamaño, la forma, el tipo de residuos y los modelos de unión dependen de la proteína (Morozova *et al.* 2006).

La subunidad sigma de la RNAP es responsable de la unión de la holoenzima a los promotores durante el inicio de la transcripción, haciendo contactos específicos con las secuencias de las regiones -10 y -35 en los promotores, además de las interacciones sigma-DNA, también ocurren interacciones proteína-proteína entre los activadores transcripcionales y las subunidades de la RNAP (Dhiman y Schleif, 2000). En muchos promotores la secuencia de reconocimiento del activador se traslapa parcialmente sobre la región -35 y se conocen como activadores de clase II (Busby y Ebright, 1999; Dove *et al.* 2003). En el promotor *perA* se ha identificado una zona de unión de PerA ubicada entre las bases -46 a -75 (Ibarra *et al.* 2003), en una región rica en AT, de modo similar a ToxT que ocurre en una zona entre -84 y -41 en el promotor *tcpA* (Yu y DiRita, 2002). Por su proximidad a la región -35 puede suponerse una posible interacción entre PerA y la subunidad σ^{70} de la RNAP, por ello en este estudio se recurrió a un banco de mutantes en esta subunidad donado por la Doctora Gross (Tabla 6). Para cada una de estas mutantes se valoró, por medio de ensayos de dominancia negativa, su capacidad de activación transcripcional utilizando un sistema de dos plásmidos: 1) un plásmido portando un gen de *rpoD* con cambios en residuos de σ^{70} y 2) la fusión *bfpA-cat* en el plásmido pAIG307

(Ibarra *et al.* datos no mostrados) o la fusión de *perA-cat* en el plásmido pYML-PerA (Tabla 4).

El resultado obtenido fue que, ninguna de las mutaciones en la subunidad sigma redujo la actividad transcripcional Cat de *bfpA-cat* en más del 60% (Figura 13). Por el contrario, la mayoría presentaron un incremento en la actividad en un 20 a 30%. Esto puede deberse a que la expresión de *bfpA* se realizó bajo dominancia negativa de cada uno de los plásmidos portando genes mutantes en ⁷⁰; o bien, a que los residuos mutados en la subunidad ⁷⁰ de la RNAP, ubicados dentro del motivo HTH de la región 4.2, participe en el reconocimiento de la región -35 (Chandrangsu y Helmann, 2014), pueden estar localizados de tal forma que, favorecen el posicionamiento del DNA promotor de *bfpA* en el centro activo de la RNAP, además esta sobreexpresión pudiera permitirle a EPEC inducir genes que le confieran resistencia a diferentes condiciones ambientales extremas. Otra posible explicación es que probablemente las sustituciones de estos residuos remuevan un contacto inhibitorio o favorezcan una mejor interacción con PerA (Lonetto *et al.* 1998). Este resultado podría señalar que durante la activación de *bfpA*, PerA no interactúa con la subunidad ⁷⁰ de la RNAP, por lo tanto no se comportaría como un activador de clase II durante la transcripción de este promotor.

Por el contrario, lo que se obtuvo con respecto a la actividad transcripcional de *perA-cat* en presencia de la dominancia negativa de cada una de las mutantes en ⁷⁰, fue que cinco residuos (E574, I590, E591, R596 y K597) redujeron considerablemente la actividad Cat en 60% o más, comparado con ⁷⁰ silvestre (*rpoD*) (Figura 14). Este resultado indica que PerA podría estar interactuando con la subunidad ⁷⁰ de la RNAP durante la activación de su propio promotor, aunque no se ha determinado el sitio preciso de unión de PerA, debido a dificultades en su purificación (Ibarra *et al.* 2003). Sin embargo, de la misma forma que AraC, que se sobrepone a la región -35 en cuatro bases durante la activación del promotor *araBAD* (Dhiman y Schleif, 2000), que MelR que ocupa las posiciones -42.5 y -

62.5 corriente arriba de su promotor *melAB* (Grainger *et al.* 2004a y b), que RhaS y RhaR que se trasponen a los hexámeros -35 de sus promotores correspondientes *rhaBAD* (Bhende y Egan, 2000) y *rhaSR* (Wickstrum y Egan, 2004) y que XylS que se traslapa sobre la región -35 del promotor Pm (González-Pérez *et al.* 2002); PerA podría comportarse como un activador de clase II sobre su propio promotor *perA*, ya que por estar próximo a la región -35, entre las posiciones -75 y -47, es posible que interactúe con la subunidad σ^{70} ; solo faltaría en deducir los residuos de PerA y de σ^{70} que interactúan entre si. Es posible que ocurra una interacción entre los residuos de carga negativa en PerA (E116, D168 y E234) y los residuos de carga positiva en la subunidad σ^{70} (R596 y K597), de modo similar a como se ha descubierto, entre el residuo D241 de RhaS y R599 de σ^{70} de la RNAP durante la activación de *rhaBAD* y *rhaT* mismos que se encuentran en proximidad entre ellos (Bhende y Egan, 2000). Similarmente entre RhaR D276 y R599 de σ^{70} (Wickstrum y Egan, 2004); entre MelR D261 y T265 con los residuos R596 y R599 de σ^{70} donde D261 se encuentra cercano a ambos residuos y el residuo T265 podría interactuar con el residuo R596, aunque debido al mal posicionamiento de MelR sobre la región promotora *melAB* es incapaz de hacer interacciones correctas con la subunidad σ^{70} (Grainger *et al.* 2004a), y, que los residuos D137 y H153 de XylS favorecen la interacción con la subunidad σ^{70} en lugar de σ^{38} durante la activación de su promotor afín (Ruiz y Ramos, 2002).

LA SUBUNIDAD α -CTD PARTICIPA EN LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE *bfpA* Y DE *perA*

-CTD es indispensable para la activación de muchos promotores independientes de activador, no obstante, se necesita para la interacción con la región UP del DNA o con proteínas activadoras en otros promotores (Ebright y Busby, 1995; Gourse *et al.* 2000). Muchos activadores transcripcionales interactúan directamente con -CTD, esta interacción incorpora a -CTD y, por lo

tanto al resto de la RNAP, al promotor blanco (Busby y Ebright, 1994); se considera que tales activadores son de clase I.

En este trabajo se contó con un banco de mutantes en la subunidad σ -CTD cedido por el Doctor Gourse (Tabla 6). Se analizaron cada una de estas mutantes en su habilidad para activar las fusiones transcripcionales *bfpA-cat* y *perA-cat* mediante ensayos de dominancia negativa, utilizando un sistema de dos plásmidos: 1) un plásmido portando un gen de *rpoA* con cambios en residuos de σ y 2) la fusión *bfpA-cat* en el plásmido pAIG307 o la fusión de *perA-cat* en el plásmido pYML-PerA, ambas en presencia de PerA silvestre en el plásmido EAF (Tabla 4). Sin embargo, debido a algunos problemas de crecimiento en los ensayos Cat, como una alternativa se examinó la expresión del transcrito de *bfpA* y de *perA* en presencia de las mutantes σ RNAP, en fondo EPEC silvestre, mediante RT-PCR semicuantitativo.

Los resultados fueron de llamar la atención, porque durante la activación transcripcional del promotor *bfpA*, se encontró que los residuos E261, L262, T263, R265, C269, E273, H276 y P293 disminuyeron la actividad específica Cat en más del 60% (Figura 15). Esto es, que PerA podría interactuar con cualquiera de estos residuos durante la activación de *bfpA*. De ser así, entonces se comportaría como un activador de clase I. Por RT-PCR ninguna de las mutantes redujo la expresión del transcrito de *bfpA* (Figura 17). A la fecha no se han buscado interacciones entre residuos específicos de σ con diferentes proteínas de la familia AraC, solamente se han identificado las interacciones entre la subunidad alfa y el activador o activadores, como entre RhaR, con CRP como coactivador, SoxS y MelR con la remoción σ - 235 (Jair *et al.* 1996; Holcroft y Egan, 2000b; Graiger *et al.* 2004b). Aunque posteriormente se determinaron, por el sistema de dos híbridos, algunos residuos en interacción entre σ -CTD R265, E261, T263 y E302 y SoxS que reducen la actividad de algunos promotores de SoxS, aún no se han identificado los residuos de SoxS que participan en esa interacción proteína-proteína (Shah y Wolf, 2004).

En cuanto a la activación del promotor *perA*, la mayoría mostraron una expresión superior al 60%, aunque, por las posiciones sobre las que se ubica PerA, no se esperaba encontrar mutaciones en la subunidad σ -CTD de la RNAP que redujeran la actividad transcripcional de *perA-cat*, se halló que R255, D258, L260 e I275 disminuyeron la actividad Cat en 70% o más (Figura 16). Por otro lado, los experimentos por RT-PCR demostraron que K271, I278, T285 y N294 redujeron considerablemente la expresión del transcrito de *perA* (Figura 18), este resultado sugiere que PerA se conduciría como un regulador de clase I al activar a su propio promotor, de modo similar a RhaR, SoxS y MelR (Jair *et al.* 1996; Holcroft y Egan, 2000b; Graiger *et al.* 2004b); o bien es una activación indirecta porque PerA se autoactiva para estimular la transcripción de *bfpA*. Entonces, esta información orienta a decir, de forma preliminar, que PerA pudiera actuar como un activador transcripcional ambidiestro, puesto que podría comportarse como un activador de clase II al interactuar con la subunidad σ ⁷⁰ durante la activación de su propio promotor *perA* y como activador de clase I al activar a *bfpA* por interactuar con la subunidad σ -CTD; en un proceso semejante al ocurrido con SoxS, que requiere de σ -CTD para activar a los promotores *zwf* y *fpr*, y es independiente de σ -CTD durante la activación de *fumC*, *micF*, *nfo* y *sodA*, cuyos sitios de unión se sobreponen al hexámero -35, de modo que SoxS puede entrar en contacto con la subunidad σ ⁷⁰ y actuar como un activador clase II (Jair *et al.* 1996). Para determinar si alguno de los residuos E116, D168 o E234 es específico en la interacción entre PerA y RNAP, se caracterizaría la interacción proteína-proteína por medio de ensayos de co-inmunoprecipitación, “pull-down”, o análisis por “Far-Western blot”.

Aunque no se debe olvidar que PerA también podría comportarse como un activador de clase I al activar a su propio promotor *perA*, debido a que se encontró una disminución del transcrito en presencia de algunas mutantes en la subunidad σ -CTD de la RNAP. Además es importante mencionar que ninguna de las mutantes en σ -CTD redujo la actividad o expresión de ambos promotores *bfpA* y

perA, a pesar de que se seleccionaron por diferentes métodos, esto proporciona seguridad a los métodos de elección de este proyecto.

Con esta información, se seleccionaron las mutaciones E574A, I590A, E591A, R596A y K597A de la subunidad γ , y, E261A, R265A, K271A, E273A, H276A, I278A, T285A y N294A de la subunidad α -CTD, para estudiar en trabajos posteriores, la interacción proteína-proteína entre PerA (E116A, D168A y E234A) y la RNAP; considerando estos resultados la presente investigación presenta un modelo de las posibles clases de interacciones de PerA con alguna de las subunidades de la RNAP durante la activación de los promotores *bfpA* y *perA*.

PROBABLES MODELOS DE REGULACIÓN

Considerando los resultados, se pueden proponer los siguientes modelos de regulación de la proteína PerA, durante la activación de sus promotores blanco *bfpA* y *perA*.

PerA como un activador transcripcional de clase I durante la activación de *bfpA* haciendo contacto con la subunidad α de la RNAP (Figura 21).

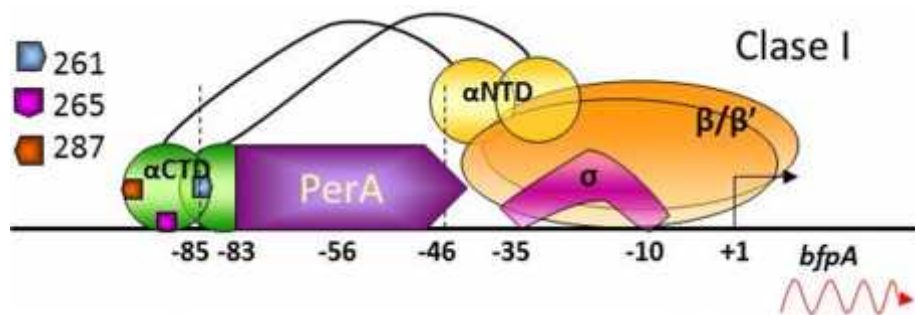


Figura 21. Activador transcripcional de clase I en el promotor *bfpA*. α : subunidad sigma de la RNAP; CTD: dominio carboxilo terminal de la subunidad alfa de la RNAP con cuadro azul determinante 261, cuadro rosa determinante 265 y cuadro rojo determinante 287.

PerA como un regulador transcripcional de clase II durante la activación de su promotor *perA* haciendo contacto con la subunidad β/β' de la RNAP (Figura 22).

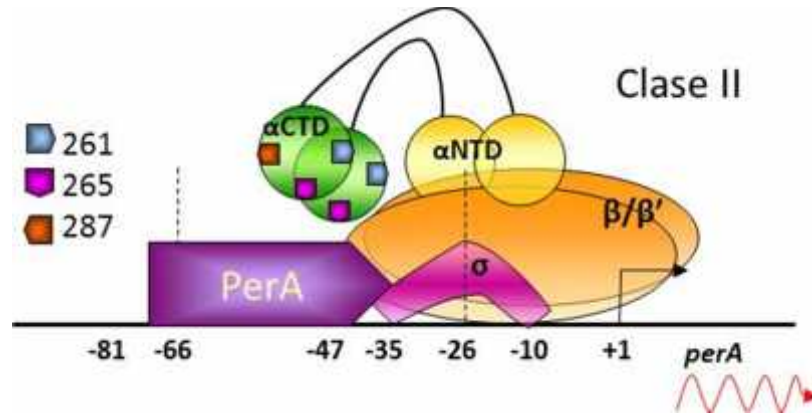


Figura 22. Activador transcripcional de clase II en el promotor *perA*. σ : subunidad sigma de la RNAP; CTD: dominio carboxilo terminal de la subunidad alfa de la RNAP con cuadro azul determinante 261, cuadro rosa determinante 265 y cuadro rojo determinante 287.

Per A como un activador transcripcional de clase I al activar a su propio promotor *perA* haciendo contacto con la subunidad β/β' de la RNAP (Figura 23).

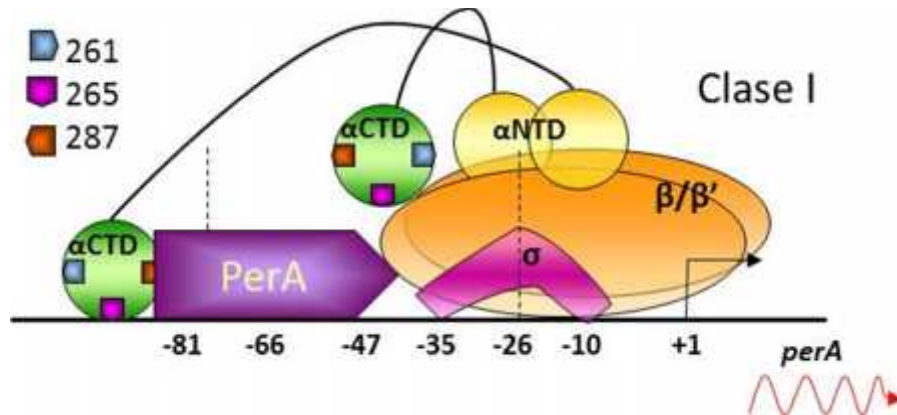


Figura 23. Activador transcripcional de clase I en el promotor *perA*. σ : subunidad sigma de la RNAP; CTD: dominio carboxilo terminal de la subunidad alfa de la RNAP con cuadro azul determinante 261, cuadro rosa determinante 265 y cuadro rojo determinante 287.

PerA ESTÁ FORMADA POR α -HÉLICES PRINCIPALMENTE

La predicción de la estructura secundaria de PerA, se realizó con el fin de observar las subestructuras adquiridas por la proteína a través de los puentes de hidrógeno establecidos entre los residuos de la cadena principal, formando α -hélices y hojas β plegadas, puesto que muestra una geometría regular y fácil de entender (Figura 19), que permitió ubicar algunos de los residuos del banco de mutantes en PerA (Figura 20). Es interesante observar que, en la comparación entre los dominios N terminal de PerA, con otras proteínas miembros de la familia AraC/XylS, como AraC, XylS, ToxT y VirF, entre otras, estas comienzan con una gran región de láminas β , con una o dos α -hélices entre ellas (datos no mostrados). Estas observaciones podrían indicar que la estructura de PerA influye en su actividad como monómero, ya que se sabe que las otras proteínas actúan en dímeros o polímeros (Dorman y Porter, 1998; Yu y DiRita, 1999; González-Pérez *et al.* 2002; Schleif, 2003).

Para aproximar la estructura secundaria de PerA, debido a que existen combinaciones de los ángulos diedros típicas para cada estructura (α -hélice y hoja β), se determinó obtener el diagrama de Ramachandran (Figura 24), a través del que es posible, ver la ubicación y el rango permitido dentro del gráfico de los ángulos diedros ϕ contra ψ de los residuos en estudio. La figura corresponde a la proteína AraC (PDB 2K9S), miembro de la familia AraC/XylS registrado en el banco de datos de proteínas, se puede ver que la mayoría de residuos se ubican en la región de baja estabilidad, pero energéticamente favorables, $\phi = -60^\circ$ a -120° y $\psi = -60^\circ$, al identificar los ángulos de los residuos mutados, se observa que los ángulos ϕ y ψ son muy cerrados para E, lo que favorece la formación de α -hélices, en cambio para D apreciamos ángulos ϕ muy cerrados y de los ángulos ψ , algunos cerrados que junto con los ϕ promueven la formación de α -hélices, y otros muy abiertos que junto con los ϕ favorecen la formación de hojas β ; como PerA tiene mayor número de residuos E y D, distribuidos en toda la extensión de la

proteína, esto podría explicar el mayor número de α -hélices presentes en la proteína.

Es claro que, los cambios en un residuo alteran el nivel de estructura de la proteína y pueden impactar dramáticamente la naturaleza y la fuerza de activación de un regulador transcripcional como PerA.

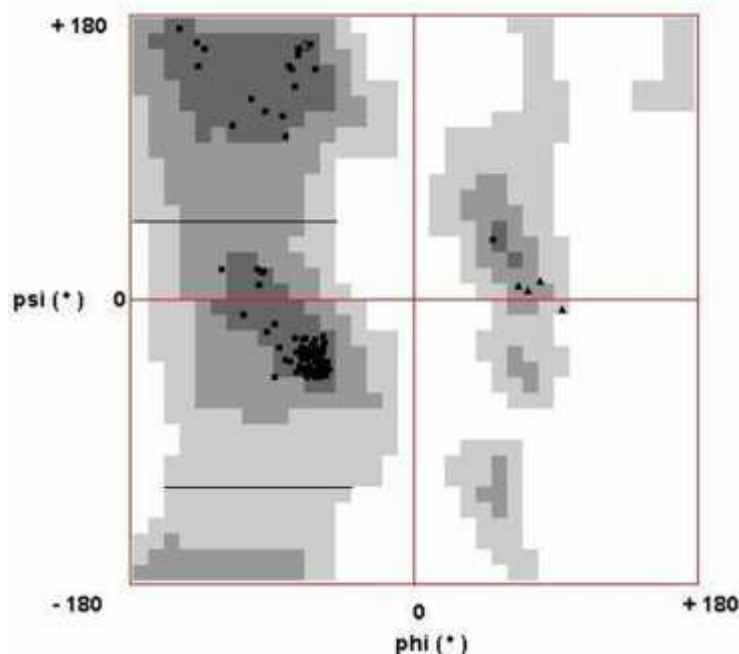


Figura 24. Diagrama de Ramachandran de la proteína AraC, obtenida por Ramachandran Plot 2.0.

Todo esto, con el objetivo de reconocer los elementos de la estructura secundaria de PerA y poder identificar los residuos aminoácidos expuestos que, en un momento dado, pudieran interactuar con la RNAP durante la activación de los promotores *bfpA*, *perA* o ambos; tomando en cuenta, especialmente la ubicación de los residuos analizados en el presente estudio.

Considerando estos resultados, faltaría por realizar pruebas de interacción entre las mutantes en la RNAP seleccionadas y las mutantes E116 y D168 en PerA, a modo de precisar los aminoácidos específicos que participan en la interacción proteína-proteína durante la activación de *bfpA* y de *perA*, y así establecer que tipo de activador es PerA, si de clase I, clase II o ambidiestro durante la activación de los promotores mencionados.

XI. CONCLUSIONES

Escherichia coli Enteropatógena (EPEC), es causa común de diarrea infantil en países en desarrollo. PerA es un activador transcripcional de la familia AraC/XylS involucrado en la producción de factores de virulencia en EPEC, como son los BFP, necesarios para la adherencia localizada a las células epiteliales y autoagregación. Los BFP se expresan por activación directa del promotor *bfpA* y por activación indirecta, a través de la auto activación de *perA*. Por lo que, entender el mecanismo de regulación para la expresión de los BFP, permitirá implementar estrategias para el control de la enfermedad.

1. Mutantes en PerA Y29, E116, D150, D168, D177 y E234 reducen la activación de los promotores *bfpA* y *perA*.
2. Mutantes en PerA E116, D168 y E234 no participan en el reconocimiento del sitio promotor.
3. Mutantes en PerA D100, D101, E116 y D168 disminuyen la expresión de *bfpA* a 40°C.
4. En presencia de amonio las mutantes en PerA D100, D101, E116 y D168 sobrerregulan la expresión de *perA*.
5. PerA disminuye la expresión de *perA* en presencia de las mutaciones en los residuos EA574, IA590, EA591, RA596 y KA597 de la subunidad α de la RNAP.
6. Ninguna de las mutantes en la subunidad β de la RNAP redujo la expresión de *bfpA* por parte de PerA.
7. PerA reduce la expresión de *bfpA* en presencia de las mutaciones en los residuos E261A, R265A, E273A y H276A de la subunidad β de la RNAP.

- 8.** PerA disminuye la expresión de *perA* en presencia de los cambios de residuos K271A, I278A, T285A y N294A de la subunidad σ^{70} de la RNAP.
- 9.** Alternativamente algunos datos sugieren que PerA puede actuar como un regulador de clase I al activar al promotor *perA*.
- 10.** El presente trabajo abordó el análisis y caracterización de mutantes tanto en el activador transcripcional PerA como en las subunidades σ^{70} de la RNAP. Se demostró que los residuos E116 y D168 activan de manera diferencial la expresión de los promotores blanco *bfpA* y *perA*. No obstante, para determinar el tipo de regulador transcripcional que supone PerA, se requiere realizar una investigación más exhaustiva que involucre la interacción entre PerA y las subunidades σ^{70} de la RNAP.

Entender como un activador puede hacer múltiples interacciones con la maquinaria de transcripción, cada interacción siendo responsable de una consecuencia biológica específica, permitirá el desarrollo de un mecanismo que inhiba a la RNAP para la transcripción de *bfpA* y *perA*.

XII. PERSPECTIVAS

- Realizar transcripción *in vitro* de *bfpA* y de *perA* en sistemas que incluyan mutantes PerA E116 y D168 y mutantes en la subunidad de la RNAP.
- Realizar transcripción *in vitro* de *bfpA* y de *perA* en sistemas que incluyan mutantes PerA E116 y D168 y mutantes en la subunidad de la RNAP.
- Determinar las diferencias estructurales relacionadas con la unión a DNA por cada una de las mutantes PerA (E116 y D168).
- Estudiar la activación de la expresión de ambos promotores en un hospedero heterólogo.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abe A, Heczko U, Hegele RG, Finlay BB.** 1998. Two enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted proteins, EspA and EspB, are virulence factors. *J Exp Med* **188**: 1907-1916.
- Abe A, de Grado M, Pfuetzner RA, Sánchez-SanMartín C, DeVinney R, Strynadka NCJ, Puente JL, Finlay BB.** 1999. Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion. *Mol Microbiol* **33**: 1162-1175.
- Adu-Bobie J, Frankel G, Bain C, Goncalves AG, Trabulsi LR, Douce G, Knutton S, Dougan G.** 1998. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol* **36**: 662-668.
- Alto NM, Shao F, Lazar CS, Brost RL, Chua G, Mattoo S, McMahon SA, Ghosh P, Hughes TR, Boone C, Dixon JE.** 2006. Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell* **124**: 133-145.
- Babu MM, Teichmann SA.** 2003. Evolution of transcription factors and the gene regulatory network in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **31**: 1234-1244.
- Banerjee S, Chalissery J, Bandey I, Sen R.** 2006. Rho-dependent transcription termination: more questions than answers. *J Microbiol* **44**: 11-22.
- Basturea GN, Boder MD, Moreno ME, Munson GP.** 2008. Residues near the Amino Terminus of Rns Are Essential for Positive Autoregulation and DNA Binding. *J Bacteriol* **190**: 2279-2285.
- Belyaeva TA, Wade JT, Webster CL, Howard VJ, Thomas MS, Hyde EI, Busby SJW.** 2000. Transcription activation at the *Escherichia coli* melAB promoter: the role of MelR and the cyclic AMP receptor protein. *Mol Microbiol* **36**: 211- 222.

- Bhavsar AP, Guttman JA, Finlay BB.** 2007. Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature* **449**: 827-834.
- Bhende PM, Egan SM.** 1999. Amino Acid-DNA Contacts by RhaS: an AraC Family Transcription Activator. *J Bacteriol* **181**: 5185-5192.
- Bhende PM, Egan SM.** 2000. Genetic evidence that transcription activation by RhaS involves specific amino acid contacts with sigma 70. *J Bacteriol* **182**: 4959-4969.
- Bokal AJ, Ross W, Gaal T, Johnson RC, Gourse RL.** 1997. Molecular anatomy of a transcription activation patch: FIS-RNA polymerase interactions at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter. *EMBO J* **16**: 154±162.
- Bose D, Pape T, Burrows PC, Rappas M, Wigneshweraraj SR, Buck M, Zhang X.** 2008. Organization of an activator-bound RNA polymerase holoenzyme. *Mol Cell* **32**: 337-46.
- Boya P, Roques B, Kroemer G.** 2001. New EMBO member's review: viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level. *EMBO J* **20**: 4325-4331.
- Brinkley C, Burland V, Keller R, Rose DJ, Boutin AT, Klink SA, Blattner FR, Kaper JB.** 2006. Nucleotide sequence analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* Adherence Factor Plasmid pMAR7. *Infect Immun* **74**: 5408-5413.
- Brosius J.** 1984. Plasmid vector for the selection of promoters. *Gene* **27**: 151-160.
- Brown T, Mackey K, Du T.** Analysis of RNA by Northern and Slot Blot Hybridization in Current Protocols in Molecular Biology (F. Ausubel *et al.*, eds.) John Wiley & Sons, Inc., New York pp. 4.9.1-4.9.19, 2004.
- Browning DF, Busby SJW.** 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 57-65.

- Buchan DWA, Minneci F, Nugent TCO, Bryson K, Jones DT.** 2013. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res* **41(W1)**: W340-W348.
- Bulgin R, Arbeloa A, Goulding D, Dougan G, Crepin VF, Raymond B, Frankel G.** 2009. The T3SS effector EspT defines a new category of invasive Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) which form intracellular actin pedestals. *PLoS Pathog* **5**: e1000683.
- Burgdorf SW, Clark CL, Burgdorf JR, Spector DH.** 2011. Mutation of glutamine to arginine at position 548 of IE2 86 in human cytomegalovirus leads to decreased expression of IE2 40, IE2 60, UL83, and UL84 and increased transcription of US8-9 and US29-32. *J Virol* **85**: 11098-110.
- Burkovski A.** 2003. I do it my way: regulation of ammonium uptake and ammonium assimilation in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol* **179**: 83-88.
- Busby S, Ebright RH.** 1994. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* **79**: 743-746.
- Busby S, Ebright RH.** 1997. Transcription activation at class II CAP-dependent promoters. *Mol Microbiol* **23**: 853-859.
- Busby S, Ebright RH.** 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**: 199-213.
- Bustamante VH, Calva E, Puente JL.** 1998. Analysis of *cis*-acting elements required for *bfpA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 3013-3016.
- Bustamante VH, Santana FJ, Calva E, Puente JL.** 2001. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* **39**: 664-678.

- Bustos SA, Schleif RF.** 1993. Functional domains of the AraC protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 5638–5642.
- Calvo JM, Matthews RG.** 1994. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **58**: 466-490.
- Campellone KG, Giese A, Tipper DJ, Leong JM.** 2002. A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. *Mol Microbiol* **43**: 1227-1241.
- Cantarelli VV, Takahashi A, Yanagihara I, Akeda Y, Imura K, Kodama T, Kono G, Sato Y, Honda T.** 2001. Talin, a host cell protein, interacts directly with the translocated intimin receptor, Tir, of entero pathogenic *Escherichia coli*, and is essential for pedestal formation. *Cell Microbiol* **3**: 745-751.
- Casadaban MJ.** 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**: 41-555.
- Chandrangsu P, Helmann JD.** 2014. Sigma factors in gene expression. In Encyclopedia of Life Sciences. Published online: March 2014. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000854.pub3.
- Chen HD, Frankel G.** 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 83-98.
- Childers BM, Weber GG, Prouty MG, Castaneda MM, Peng F, Klose KE.** 2007. Identification of residues critical for the function of the *Vibrio cholerae* virulence regulator ToxT by scanning alanine mutagenesis. *J Mol Biol* **367**: 1413-30.
- Choudhuri S.** 2004. Gene regulation and molecular toxicology. *Toxicol Mech Methods* **15**: 1-23.

- Ciampi MS.** 2006. Rho-dependent terminators and transcription termination. *Microbiology* **152**: 2515-2528.
- Clarke SC, Haigh RD, Freestone PPE, Williams PH.** 2003. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* **16**: 365-378.
- Cole C, Barber JD, Barton GJ.** 2008. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* **36(suppl 2)**: W197-W201.
- Cossart P, Sansonetti PJ.** 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**: 242-248.
- Crane JK, McNamara BP, Donnenberg MS.** 2001. Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**: 197-211.
- Croxen MA, Finlay BB.** 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **8**: 26-38.
- Daniell SJ, Takahashi N, Wilson R, Friedberg D, Rosenshine I, Booy FP, Shaw RK, Knutton S, Frankel G, Aizawa S.** 2001. The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**: 865-871.
- Dean P, Maresca M, Kenny B.** 2005. EPEC's weapons of mass subversion. *Curr Opin Microbiol* **8**: 28-34.
- Dean P, Kenny B.** 2009. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr Opin Microbiol* **12**: 101-109.
- De Grado M, Abe A, Gauthier A, Steele-Mortimer O, DeVinney R, Finlay BB.** 1999. Identification of the intimin-binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **1**: 7-17.
- Dhiman A, Schleif R.** 2000. Recognition of overlapping nucleotides by AraC and the sigma subunit of RNA polymerase. *J Bacteriol* **182**: 5076-5081.

- Domínguez-Cuevas P, Marín P, Busby S, Ramos JL, Marqués S.** 2008a. Roles of effectors in XylS-dependent transcription activation: intramolecular domain derepression and DNA binding. *J Bacteriol* **190**: 3118-3128.
- Domínguez-Cuevas P, Marín P, Marqués S, Ramos JL.** 2008b. XylS-Pm promoter interactions through two helix-turn-helix motifs: identifying XylS residues important for DNA binding and activation. *J Mol Biol* **375**: 59-69.
- Donnenberg MS, Kaper JB.** 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **60**: 3953-3961.
- Donnenberg MS, Tacket CO, James SP, Losonsky G, Nataro JP, Wasserman SS, Kaper JB, Levine MM.** 1993. The role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J Clin Invest* **92**: 1412-1417.
- Dorman CJ, Porter ME.** 1998. The *Shigella* virulence gene regulatory cascade: a paradigm of bacterial gene control mechanisms. *Mol Microbiol* **29**: 677-684.
- Dove SL, Darst SA, Hochschild A.** 2003. Region 4 of as a target for transcription regulation. *Mol Microbiol* **48**: 863–874.
- Ebright R, Busby S.** 1995. *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit: structure and function. *Curr Opin Genet Dev* **5**: 197-200.
- Eddabra L, Wenner T, El Btaouri H, Baranek T, Madoulet C, Cornillet-Lefebvre P, Morjani H.** 2012. Arginine 482 to glycine mutation in ABCG2/BCRP increases etoposide transport and resistance to the drug in HEK-293 cells. *Oncol Rep* **27**: 232-237.
- Egan SM, Pease AJ, Lang J, Li X, Rao V, Gillette WK, Ruiz R, Ramos JL, Wolf Jr RE.** 2000. Transcription activation by a variety of AraC/XylS family activators does not depend on the class II-specific activation determinant in the N-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *J Bacteriol* **182**: 7075-7077.

- Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, McNamara BP, Donnenberg MS, Kaper JB.** 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* **28**: 1-4.
- Fagundes-Neto U, Affonso-Scaletsky IC.** 2000. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. *S Paulo Med J/Rev Paul Med* **118**: 21-29.
- Frankel G, Candy DCA, Everest P, Dougan G.** 1994. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infect Immun* **62**: 1835-1842.
- Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, Knutton S.** 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* **30**: 911-921.
- Friedberg D, Umanski T, Fang Y, Rosenshine I.** 1999. Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **34**: 941-952.
- Gallegos MT, Schleif R, Bairoch A, Hofmann K, Ramos JL.** 1997. AraC/XylS Family of Transcriptional Regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 393-410.
- Girón JA, Ho ASY, Schoolnik GK.** 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**: 710-713.
- Goldberg MD, Johnson M, Hinton JCD, Williams PH.** 2001. Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**: 549-559.

- González-Pérez MM, Marqués S, Domínguez-Cuevas P, Ramos JL.** 2002. XylS activator and RNA polymerase binding sites at the Pm promoter overlap. *FEBS Lett* **519**: 117-122.
- Goosney DL, DeVinney R, Finlay BB.** 2001. Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. *Infect Immun* **69**: 3315-3322.
- Gourse RL, Ross W, Gaal T.** 2000. Ups and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol Microbiol* **37**: 687-695.
- Grainger DC, Belyaeva TA, Lee DJ, Hyde EI, Busby SJW.** 2003. Binding of the *Escherichia coli* MelR protein to the *melAB* promoter: orientation of MelR subunits and investigation of MelR–DNA contacts. *Mol Microbiol* **48**: 335–348.
- Grainger DC, Webster CL, Belyaeva TA, Hyde EI, Busby SJW.** 2004a. Transcription activation at the *Escherichia coli melAB* promoter: interactions of MelR with its DNA target site and with domain 4 of the RNA polymerase subunit. *Mol Microbiol* **51**: 1297–1309.
- Grainger DC, Belyaeva TA, Lee DJ, Hyde EI, Busby SJW.** 2004b. Transcription activation at the *Escherichia coli melAB* promoter: interactions of MelR with the C-terminal domain of the RNA polymerase subunit. *Mol Microbiol* **51**: 1311–1320.
- Grant AJ, Farris M, Alefounder P, Williams PH, Woodward MJ, O'Connor CD.** 2003. Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Mol Microbiol* **48**: 507-521.
- Griffith KL, Wolf Jr RE.** 2001. Systematic mutagenesis of the DNA binding sites for SoxS in the *Escherichia coli zwf* and *fpr* promoters: identifying nucleotides

- required for DNA binding and transcription activation. *Mol Microbiol* **40**: 1141-1154.
- Griffith KL, Wolf Jr RE.** 2002. A comprehensive alanine scanning mutagenesis of the *Escherichia coli* transcriptional activator SoxS: identifying amino acids important for DNA-binding and transcription activation. *J Mol Biol* **322**: 237-257.
- Griffith KL, Shah IM, Myers TE, O'Neill MC, Wolf Jr RE.** 2002. Evidence for 'pre-recruitment' as a new mechanism of transcription activation in *Escherichia coli*: the large excess of SoxS binding sites per cell relative to the number of SoxS molecules per cell. *Biochem Biophys Res Commun* **291**: 979-986.
- Griffith KL, Wolf Jr RE.** 2004. Genetic evidence for pre-recruitment as the mechanism of transcription activation by SoxS of *Escherichia coli*: the dominance of DNA binding mutations of SoxS. *J Mol Biol* **344**: 1-10.
- Gruber TM, Gross CA.** 2003. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**: 441-466.
- Gruenheid S, DeVinney R, Bladt F, Goosney D, Gelkop S, Gish GD, Pawson T, Finlay BB.** 2001. Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat Cell Biol* **3**: 856-859.
- Guttman JA, Li Y, Wickham ME, Deng W, Vogl AW, Finlay BB.** 2006. Attaching and effacing pathogen-induced tight junction disruption *in vivo*. *Cell Microbiol* **8**: 634-645.
- Haack KR, Robinson CL, Miller KJ, Fowlkes JW, Mellies JL.** 2003. Interaction of Ler at the LEE5 (*tir*) operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**: 384-392.
- Harmer T, Wu M, Schleif R.** 2001. The role of rigidity in DNA looping-unlooping by AraC. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 427-431.

- Hartland EL, Batchelor M, Delahay RM, Hale C, Matthews S, Dougan G, Knutton S, Connerton I, Frankel G.** 1999. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Mol Microbiol* **32**: 151-158.
- Hayward RS, Igarashi K, Ishihama A.** 1991. Functional specialization within the subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol* **221**: 23-29.
- Hazen TH, Sahl JW, Fraser CM, Donnenberg MS, Scheutz F, Rasko DA.** 2013. Refining the pathovar paradigm via phylogenomics of the attaching and effacing *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 12810–12815.
- Hochschild A, Dove SL.** 1998. Protein-protein contacts that activate and repress prokaryotic transcription. *Cell* **92**: 597-600.
- Holcroft CC, Egan SM.** 2000a. Roles of cyclic AMP receptor protein and the carboxyl-terminal domain of the σ subunit in transcription activation of the *Escherichia coli* *rhaBAD* operon. *J Bacteriol* **182**: 3529-3535.
- Holcroft CC, Egan SM.** 2000b. Interdependence of activation at *rhaSR* by cyclic AMP receptor protein, the RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain, and RhaR. *J Bacteriol* **182**: 6774-6782.
- Huang Z, Sutton SE, Wallenfang AJ, Orchard RC, Wu X, Feng Y, Chai J, Alto NM.** 2009. Structural insights into host GTPase isoform selection by a family of bacterial GEF mimics. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 853-860.
- Hudson BP, Quispe J, Lara-Gonzalez S, Kim Y, Berman HM, Arnold E, Ebright RH, Lawson CL.** 2009. Three-dimensional EM structure of an intact activator-dependent transcription initiation complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 19830-19835.
- Hulbert RR, Taylor RK.** 2002. Mechanism of ToxT-dependent transcriptional activation at the *Vibrio cholerae* *tcpA* promoter. *J Bacteriol* **184**: 5533-5544.

- Hwang J, Bieber D, Ramer SW, Wu C-Y, Schoolnik GK.** 2003. Structural and topographical studies of the type IV Bundle-Forming Pilus assembly complex of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**: 6695-6701.
- Hyland RM, Sun J, Griener TP, Mulvey GL, Klassen JS, Donnenberg MS, Armstrong GD.** 2008. The bundlin pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an *N*-acetylactosamine-specific lectin. *Cell Microbiol* **10**: 177-187.
- Ibarra JA, Villalba MI, Puente JL.** 2003. Identification of the DNA binding sites of PerA, the transcriptional activator of the *bfp* and *per* operons in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**: 2835-2847.
- Ibarra JA, García-Zacarias CM, Lara-Ochoa C, Carabarin-Lima A, Tecpanecatl-Xihuitl JS, Perez-Rueda E, Martínez-Laguna Y, Puente JL.** 2013. Further characterization of functional domains of PerA, role of amino and carboxy Terminal domains in DNA binding. *PLoS One* **8**: e56977.
- Ide T, Laarmann S, Greune L, Schillers H, Oberleithner H, Schmidt MA.** 2001. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**: 669-679.
- Iguchi A, Thomson NR, Ogura Y, Saunders D, Ooka T, Henderson IR, Harris D, Asadulghani M, Kurokawa K, Dean P, Kenny B, Quail MA, Thurston S, Dougan G, Hayashi T, Parkhill J, Frankel Gad.** 2009. The complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *E. coli* O127:H6 strain E2348/69. *J Bacteriol* **191**: 347-354.
- Jair KW, Martin R, Rosner J, Fujita N, Ishihama A, Wolf Jr RE.** 1995. Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of *Escherichia coli* multiple antibiotic and superoxide resistance promoters. *J Bacteriol* **177**: 7100-7104.

- Jair KW, Fawcett WP, Fujita N, Ishihama A, Wolf Jr RE.** 1996. Ambidextrous transcriptional activation by SoxS: requirement for the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit in a subset of *Escherichia coli* superoxide-inducible genes. *Mol Microbiol* **19**: 307-317.
- Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB.** 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7839-7843.
- Jishage M, Dasgupta D, Ishihama A.** 2001. Mapping of the RSD contact site on the sigma 70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Bacteriol* **183**: 2952-2956.
- Johnson CM, Schleif RF.** 2000. Cooperative action of the catabolite activator protein and AraC in vitro at the *araFGH* promoter. *J Bacteriol* **182**: 1995–2000.
- Kaldalu N, Toots U, De Lorenzo V, Ustav M.** 2000. Functional domains of the TOL plasmid transcription factor XylS. *J Bacteriol* **182**: 1118-1126.
- Kalman D, Weiner OD, Goosney DL, Sedat JW, Finlay BB, Abo A, Bishop JM.** 1999. Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. *Nat Cell Biol* **1**: 389-391.
- Kaltenbach LS, Braaten BA, Low DA.** 1995. Specific binding of PapI to Lrp-pap DNA complexes. *J Bacteriol* **177**: 6449-55.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**: 123-140.
- Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB.** 1997a. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**: 511-520.

- Kenny B, Abe A, Stein M, Finlay BB.** 1997b. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* **65**: 2606-2612.
- Kenny B.** 1999. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol* **31**: 1229-1241.
- Kenny B, Jepson M.** 2000. Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. *Cell Microbiol* **2**: 579-590.
- Kenny B.** 2002. Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. *Int J Med Microbiol* **291**: 469-477.
- Kenny B, Ellis S, Leard AD, Warawa J, Mellor H, Jepson MA.** 2002. Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. *Mol Microbiol* **44**: 1095-1107.
- Klapproth JM, Donnenberg MS, Abraham JM, James SP.** 1996. Products of enteropathogenic *E. coli* inhibit lymphokine production by gastrointestinal lymphocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **271**: G841-G848.
- Klapproth JM, Scaletsky ICA, McNamara BP, Lai LC, Malstrom C, James SP, Donnenberg MS.** 2000. A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. *Infect Immun* **68**: 2148-2155.
- Kodama T, Akeda Y, Kono G, Takahashi A, Imura K, Iida T, Honda T.** 2002. The EspB protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* interacts directly with alpha-catenin. *Cell Microbiol* **4**: 213-222.
- Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, Wolff C, Dougan G, Frankel G.** 1998. A novel EspA-associated surface organelle of

enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* **17**: 2166-2176.

Krukonis ES, Yu RR, DiRita VJ. 2000. The *Vibrio cholerae* ToxR/TcpP/ToxT virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter. *Mol Microbiol* **38**: 67-84.

Kwon HJ, Bennik MH, Demple B, Ellenberger T. 2000. Crystal structure of the *Escherichia coli* Rob transcription factor in complex with DNA. *Nat Struct Biol* **7**: 424-430.

Lara-Ochoa C. 2004. Mutantes del activador transcripcional PerA que alteran la expresión de los genes *bfp* en *Escherichia coli* enteropatógena. Tesis de Maestría.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.

Lässig M. 2007. From biophysics to evolutionary genetics: statistical aspects of gene regulation. *BMC Bioinformatics* **8**: S7.

Lawson CL, Swigon D, Murakami KS, Darst SA, Berman HM, Ebright RH. 2004. Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 10-20.

Lee DJ, Minchin SD, Busby SJ. 2012. Activating transcription in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **66**: 125-152.

Lee SK, Chou HH, Pflieger BF, Newman JD, Yoshikuni Y, Keasling JD. 2007. Directed evolution of AraC for improved compatibility of arabinose- and lactose-inducible promoters. *Appl Environ Microbiol* **73**: 5711-5715.

- Lefèvre F, Rémy MH, Masson JM.** 1997. Alanine-stretch scanning mutagenesis: a simple and efficient method to probe protein structure and function. *Nucleic Acids Res* **25**: 447-448.
- Levine MM, Bergquist EJ, Nalin DR, Waterman DH, Hornick RB, Young CR, Sotman S.** 1978. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* **1**: 1119-1122.
- Levine MM, Nataro JP, Karch H, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Clenments ML, O'Brien AD.** 1985. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* **152**: 550-559.
- Levine M.** In MCB141 Developmental Biology, Regulation of differential gene expression, University of California, Berkeley. Chapter 8. Control of Gene Expression [mcb.berkeley.edu/courses/mcb141/.../Levine/ECBChapter8.pdf]
- Li Z, Demple B.** 1994. SoxS, an activator of superoxide stress genes in *Escherichia coli*. Purification and interaction with DNA. *J Biol Chem* **269**: 18371-18377.
- Lloyd G, Landini P, Busby S.** 2001. Activation and repression of transcription initiation in bacteria. *Essays Biochem* **37**: 17-31.
- Lonetto M, Rhodius V, Lamberg K, Kiley P, Busby S, Gross C.** 1998. Identification of a contact site for different transcription activators in region 4 of the *Escherichia coli* RNA polymerase ⁷⁰ subunit. *J Mol Biol* **284**: 1353-1365.
- Lowden MJ, Skorupski K, Pellegrini M, Chiorazzo MG, Taylor RK, Jon Kull F.** 2010. Structure of *Vibrio cholerae* ToxT reveals a mechanism for fatty acid regulation of virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 2860-2865.

- Lund O, Nielsen M, Lundegaard C, Worning P.** CPHmodels 2.0: X3M a computer program to extract 3D models. Abstract at the CASP5 conference A102, 2002.
- Ma C, Wickham ME, Guttman JA, Deng W, Walker J, Madsen KL, Jacobson K, Vogl WA, Finlay BB, Vallance BA.** 2006. *Citrobacter rodentium* infection causes both mitochondrial dysfunction and intestinal epithelial barrier disruption *in vivo*: role of mitochondrial associated protein (Map). *Cell Microbiol* **8**: 1669-1686.
- Mahon V, Smyth CJ, Smith SGJ.** 2010. Mutagenesis of the Rns regulator of enterotoxigenic *Escherichia coli* reveals roles for a linker sequence and two helix–turn–helix motifs. *Microbiology* **156**: 2796-2806.
- Malstrom C, James S.** 1998. Inhibition of murine splenic and mucosal lymphocyte function by enteric bacterial products. *Infect Immun* **66**: 3120-3127.
- Manzanera M, Marqués S, Ramos JL.** 2000. Mutational analysis of the highly conserved C-terminal residues of the XylS protein, a member of the AraC family of transcriptional regulators. *FEBS Lett* **476**: 312-317.
- Marchès O, Ledger TN, Boury M, Ohara M, Tu X, Goffaux F, Mainil J, Rosenshine I, Sugai M, De Rycke J, Oswald E.** 2003. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol Microbiol* **50**: 1553-1567.
- Marchès O, Wiles S, Dziva F, La Ragione RM, Schüller S, Best A, Phillips AD, Hartland EL, Woodward MJ, Stevens MP, Frankel G.** 2005. Characterization of two non-locus of enterocyte effacement-encoded type III-translocated effectors, NleC and NleD, in attaching and effacing pathogen. *Infect Immun* **73**: 8411-8417.

- Marchès O, Covarelli V, Dahan S, Cougoule C, Bhatta P, Frankel G, Caron E.** 2008. EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsono-phagocytosis. *Cell Microbiol* **10**: 1104-1115.
- Martin RG, Gillette WK, Rhee S, Rosner JL.** 1999. Structural requirements for marbox function in transcriptional activation of *mar/sox/rob* regulon promoters in *Escherichia coli*: sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter. *Mol Microbiol* **34**: 431-441.
- Martin RG, Gillette WK, Rosner JL.** 2000. Promoter discrimination by the related transcriptional activators MarA and SoxS: differential regulation by differential binding. *Mol Microbiol* **35**: 623-34.
- Martin RG, Gillette WK, Martin NI, Rosner JL.** 2002. Complex formation between activator and RNA polymerase as the basis for transcriptional activation by MarA and SoxS in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **43**: 355-370.
- Martin RG, Rosner JL.** 2011. Promoter discrimination at class I MarA regulon promoters mediated by glutamic acid 89 of the MarA transcriptional activator of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **193**: 506-515.
- Martínez-Antonio A, Collado-Vides J.** 2003. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **6**: 482-489.
- Martínez-Laguna Y, Calva E, Puente JL.** 1999. Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**: 153-166.
- Mayer MP.** 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**: 41-6.
- McNamara BP, Donnenberg MS.** 1998. A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic *Escherichia coli* via the type III export pathway. *FEMS Microbiol Lett* **166**: 71-78.

- McNamara BP, Koutsouris A, O'Connell CB, Nougayrede JP, Donnenberg MS, Hecht G.** 2001. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J Clin Invest* **107**: 621-629.
- Medrano AI, DiRita VJ, Castillo G, Sanchez J.** 1999. Transient transcriptional activation of the *Vibrio cholerae* El Tor virulence regulator ToxT in response to culture conditions. *Infect Immun* **67**: 2178-2183.
- Mellies JL, Elliot SJ, Sperandio V, Donnenberg MS, Kaper JB.** 1999. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* **33**: 296-306.
- Mellies JL, Navarro-Garcia F, Okeke I, Frederickson J, Nataro JP, Kaper JB.** 2001. *espC* pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. *Infect Immun* **69**: 315-324.
- Mencia M, Monsalve M, Salas M, Rojo F.** 1996. Transcriptional activator of the phage phi29 late promoter: mapping of residues involved in interaction with RNA polymerase and in DNA bending. *Mol Microbiol* **20**: 273±282.
- Moore DD, Dowhan D.** Preparation and analysis of DNA. In Current Protocols in Molecular Biology (F. Ausubel *et al.*, eds.) John Wiley & Sons, Inc., New York pp. 2.0.1-2.0.3, 2002.
- Morelle G.** 1989. A plasmid extraction procedure on a miniprep scale. *Focus* **11**: 7-8.
- Morozova N, Allers J, Myers J, Shamoo Y.** 2006. Protein–RNA interactions: exploring binding patterns with a three-dimensional superposition analysis of high resolution structures. *Bioinformatics* **22**: 2746-2752.

- Müller T, Walter B, Wirtz A, Burkovski A.** 2006. Ammonium toxicity in bacteria. *Curr Microbiol* **52**: 400-406.
- Mundy R, Jenkins C, Yu J, Smith H, Frankel G.** 2004. Distribution of *espI* among clinical enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J Med Microbiol* **53**: 1145-1149.
- Munson GP, Scott JR.** 1999. Binding site recognition by Rns, a virulence regulator in the AraC family. *J Bacteriol* **181**: 2110–2117.
- Murakami KS, Masuda S, Darst SA.** 2002. Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4Å resolution. *Science* **296**: 1280-1284.
- Nataro JP, Kaper JB.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.
- Nielsen M, Lundegaard C, Lund O, Petersen TN.** 2010. CPHmodels-3.0 - Remote homology modeling using structure guided sequence profiles. *Nucleic Acids Res* **38**, doi:10.1093/nar/gkq535
- Niland P, Hühne R, Müller-Hill B.** 1996. How AraC Interacts Specifically with its Target DNAs. *J Mol Biol* **264**: 667-74.
- Nougayrède JP, Fernandes PJ, Donnenberg MS.** 2003. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol* **5**: 359-372.
- Nougayrède J, Donnenberg MS.** 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. *Cell Microbiol* **6**: 1097-1111.
- Olekhovich IN, Kadner RJ.** 1999. RNA Polymerase and ⁷⁰ subunits participate in transcription of the *Escherichia coli* *uhpT* promoter. *J Bacteriol* **181**: 7266-7273.

- Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marches O, Caprioli A.** 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun* **68**: 64-71.
- Ouali M, King RD.** 2000. Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. *Protein Sci* **9**: 1162-1176.
- Pérez-Rueda E, Collado-Vides J.** 2000. The repertoire of DNA binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* **28**: 1838-1847.
- Phillips AD, Frankel G.** 2000. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis* **181**: 1496-1500.
- Porter ME, Dorman CJ.** 2002. In vivo DNA-binding and oligomerization properties of the *Shigella flexneri* AraC-like transcriptional regulator VirF as identified by random and site-specific mutagenesis. *J Bacteriol* **184**: 531-539.
- Porter ME, Mitchell P, Roe AJ, Free A, Smith DGE, Gally DL.** 2004. Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54**:1117-1133.
- Prelich G.** 2012. Gene overexpression: Uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics* **190**: 841-854.
- Prouty MG, Osorio CR, Klose KE.** 2005. Characterization of functional domains of the *Vibrio cholera* virulence regulator ToxT. *Mol Microbiol* **58**: 1143-1156.
- Puente JL, Bieber D, Ramer SW, Murray W, Schoolnik GK.** 1996. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* **20**: 87-100.

- Puertas M.** 1999. Genética, fundamentos y perspectivas. McGraw-Hill-Interamericana. España. Pp. 609-610.
- Quitard S, Dean P, Maresca M, Kenny B.** 2006. The enteropathogenic *Escherichia coli* EspF effector molecule inhibits PI-3 kinase-mediated uptake independently of mitochondrial targeting. *Cell Microbiol* **8**: 972-981.
- Ramer SW, Schoolnik GK, Wu CY, Hwang J, Schmidt SA, Bieber D.** 2002. The type IV pilus assembly complex: biogenic interactions among the bundle-forming pilus proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 3457-3465.
- Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GSA, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, Crabtree J, Sebahia M, Thomson NR, Chaudhuri R, Henderson IR, Sperandio V, Ravel J.** 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: Comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol* **190**: 6881-6893.
- Reed, WL, Schleif RF.** 1999. Hemiplegic mutations in AraC protein. *J Mol Biol* **294**: 417-425.
- Reitzer L.** 2003. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **57**: 155-176.
- Rhee S, Martin RG, Rosner JL, Davies DR.** 1998. A novel DNA-binding motif in MarA: The first structure for an AraC family transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10413-10418.
- Rodgers ME, Schleif R.** 2008. DNA tape measurements of AraC. *Nucleic Acids Res* **36**: 404–410.
- Rodionov DA.** 2007. Comparative genomic reconstruction of transcriptional regulatory networks in bacteria. *Chem Rev* **107**:3467–3497.
- Rosenshine I, Ruschkowski S, Finlay BB.** 1996. Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase,

- temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. *Infect Immun* **64**: 966-973.
- Ross JJ, Gryczynski U, Schleif R.** 2003. Mutational analysis of residue roles in AraC function. *J Mol Biol* **328**: 85–93.
- Rost B.** 2001. Protein secondary structure prediction continues to rise. *J Struct Biol* **134**: 204-218.
- Ruiz R, Ramos JL.** 2002. Residues 137 and 153 at the N terminus of the XylS protein influence the effector profile of this transcriptional regulator and the factor used by RNA polymerase to stimulate transcription from its cognate promoter. *J Biol Chem* **277**: 7282-7286.
- Ruiz R, Marqués S, Ramos JL.** 2003. Leucines 193 and 194 at the N-terminal domain of the XylS protein, the positive transcriptional regulator of the TOL *meta*-cleavage pathway, are involved in dimerization. *J Bacteriol* **185**: 3036-3041.
- Saldaña Z, Erdem AL, Schüller S, Okeke IN, Lucas M, Sivananthan A, Phillips AD, Kaper JB, Puente JL, Girón JA.** 2009. The *Escherichia coli* common pilus and the Bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. *J Bacteriol* **191**: 3451-3461.
- Sambrook J, Russell DW.** 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sánchez-San Martín C, Bustamante VH, Calva E, Puente JL.** 2001. Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-cesT-eae* operon of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 2823–2833.
- Santana-Anaya A.** 2004. Mutagénesis del motivo HTH-1 en el dominio carboxilo terminal del regulador transcripcional PerA de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). Tesis de Licenciatura.

- Savery NJ, Lloyd GS, Busby SJW, Thomas MS, Ebright RH, Gourse RL.** 2002. Determinants of the C-terminal domain of the *Escherichia coli* RNA polymerase subunit important for transcription at class I cyclic AMP receptor protein-dependent promoters. *J Bacteriol* **184**: 2273-2280.
- Saviola B, Seabold RR, Schleif RF.** 1998a. DNA bending by AraC: a negative mutant. *J Bacteriol* **180**: 4227–4232.
- Saviola B, Seabold R, Schleif RF.** 1998b. Arm-domain interactions in AraC. *J Mol Biol* **278**: 539-548.
- Schleif R.** 2003. AraC protein: a love - hate relationship. *BioEssays* **25**: 274-282.
- Schmidt H, Hensel M.** 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **17**: 14-56.
- Sekiya K, Ohishi M, Ogino T, Tamanoi K, Sasakawai C, Abe A.** 2001. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 11638-11643.
- Shah IM, Wolf Jr RE.** 2004. Novel protein-protein interaction between *Escherichia coli* SoxS and the DNA binding determinant of the RNA polymerase subunit: SoxS functions as a co-sigma factor and redeploys RNA polymerase from UP-element-containing promoters to SoxS-dependent promoters during oxidative stress. *J Mol Biol* **343**: 513-532.
- Shaw K.** 2008. Negative transcription regulation in prokaryotes. *Nature Education* **1**:122.
- Shendure JA, Porreca GJ, Church GM, Gardner AF, Hendrickson CL, Kieleczawa J, Slatko BE.** Overview of DNA sequencing strategies in Current Protocols in Molecular Biology (F. Ausubel *et al.*, eds.) John Wiley & Sons, Inc., New York pp. 7.1.1-7.1.23, 1996.

- Shin S, Castanie-Cornet MP, Foster JW, Crawford JA, Brinkley C, Kaper JB.** 2001. An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. *Mol Microbiol* **41**: 1133-1150.
- Shivers RP, Sonenshein AL.** 2004. Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. *Mol Microbiol* **53**: 599-611.
- Sohel I, Puente JL, Ramer SW, Bieber D, Wu CY, Schoolnik GK.** 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli*: Identification of a gene cluster coding for Bundle-Forming Pilus morphogenesis. *J Bacteriol* **178**: 2613–2628.
- Soisson SM, MacDougall-Shackleton B, Schleif R, Wolberger C.** 1997. Structural basis for ligand-regulated oligomerization of AraC. *Science* **276**: 421-5.
- Sperandio V, Mellies JL, Nguyen W, Shin S, Kaper JB.** 1999. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 15196-15201.
- Sperandio V, Mellies JL, Delahay RM, Frankel G, Crawford JA, Nguyen W, Kaper JB.** 2000. Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler. *Mol Microbiol* **38**: 781-793.
- Sperandio V, Torres AG, Kaper JB.** 2002. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol Microbiol* **43**: 809-821.
- Stein M, Kenny B, Stein MA, Finlay BB.** 1996. Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is

- homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J Bacteriol* **178**: 6546-6554.
- Swimm AI, Kalman D.** 2008. Cytosolic extract induces Tir translocation and pedestals in EPEC-infected red blood cells. *PLoS Pathog* **4**: e4.
- Tarr CL, Whittam TS.** 2002. Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 479-487.
- Tecpanecatl-Xihuitl JS.** 2003. Análisis genético de PerA (BfpT), el regulador transcripcional de los operones *bfp* y *per* en *Escherichia coli* enteropatógena. Tesis de Maestría.
- Tobe T, Schoolnik GK, Sohel I, Bustamante VH, Puente JL.** 1996. Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**: 963-975.
- Tobe T, Hayashi T, Han CG, Schoolnik GK, Ohtsubo E, Sasakawa C.** 1999. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. *Infect Immun* **67**: 5455-5462.
- Trabulsi LR, Keller R, Tardelli-Gomes TA.** 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* **8**: 508-513.
- Tu X, Nisan I, Yona C, Hanski E, Rosenshine I.** 2003. EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **47**: 595-606.
- Vallance BA, Finlay BB.** 2000. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8799-8806.
- van Hijum SAFT, Medema MH, Kuipers OP.** 2009. Mechanisms and evolution of control logic in prokaryotic transcriptional regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 481-509.

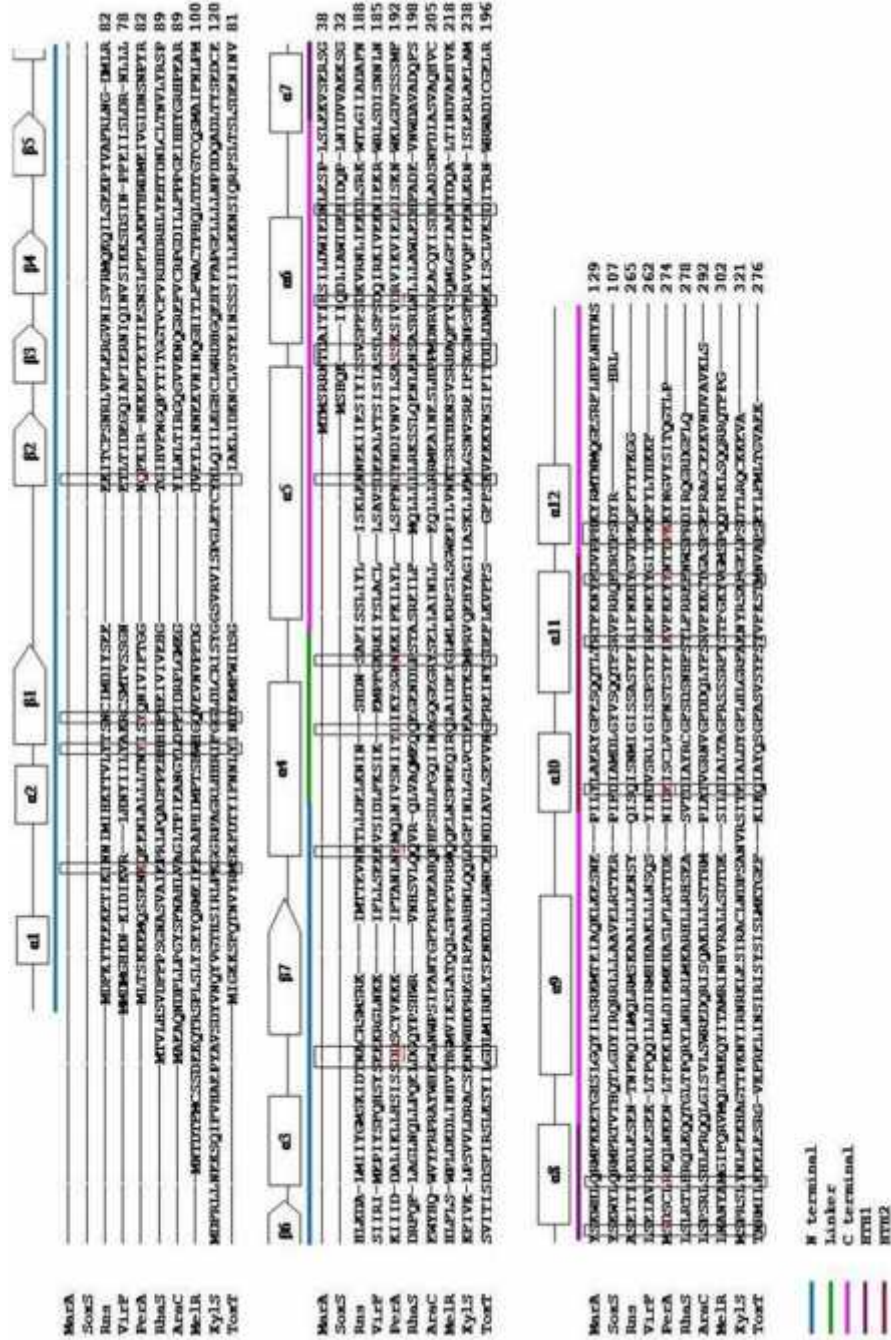
- Vicente M, Chater KF, de Lorenzo V.** 1999. Bacterial transcription factors involved in global regulation. *Mol Microbiol* **33**: 8-17.
- von Wirén N, Merrick M.** 2004. Regulation and function of ammonium carriers in plants, yeast and bacteria. *Top Curr Genet* **9**: 95-120.
- Voskuil MI, Chambliss GH.** 2002. The TRTGn motif stabilizes the transcription initiation open complex. *J Mol Biol* **322**:521–532.
- Wachter C, Beinke C, Mattes M, Schmidt MA.** 1999. Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **31**: 1695-1707.
- Wade JT, Belyaeva TA, Hyde EI, Busby SJW.** 2000. Repression of the *Escherichia coli melR* promoter by MelR: evidence that efficient repression requires the formation of a repression loop. *Mol Microbiol* **36**: 223-229.
- Wade JT, Belyaeva TA, Hyde EI, Busby SJ.** 2001. A simple mechanism for co-dependence on two activators at an *Escherichia coli* promoter. *EMBO J* **20**: 7160-7167.
- Wang YP, Kolb A, Buck M, Wen J, O’Gara F, Buc H.** 1998. CRP interacts with promoter-bound ⁵⁴ RNA polymerase and blocks transcriptional activation of the *dctA* promoter. *EMBO J* **17**: 786-796.
- Weldon JE, Schleif RF.** 2006. Specific interactions by the N-terminal arm inhibit self-association of the AraC dimerization domain. *Protein Sci* **15**: 2828-2835.
- Wentzel A, Christmann A, Adams T, Kolmar H.** 2001. Display of passenger proteins on the surface of *Escherichia coli* K-12 by the enterohemorrhagic *E. coli* intimin EaeA. *J Bacteriol* **183**: 7273-7284.
- Wickstrum JR, Egan SM.** 2004. Amino acid contacts between sigma 70 domain 4 and the transcription activators RhaS and RhaR. *J Bacteriol* **186**: 6277–6285.

- Withey JH, DiRita VJ.** 2006. The toxbox: specific DNA sequence requirements for activation of *Vibrio cholerae* virulence genes by ToxT. *Mol Microbiol* **59**: 1779-1789.
- Wolff C, Nisan I, Hanki E, Frankel G, Rosenshine I.** 1998. Protein translocation into epithelial cells by infecting enteropathogenic enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**: 143-155.
- Wood TI, Griffith KL, Fawcett WP, Jair KW, Schneider TD, Wolf Jr RE.** 1999. Interdependence of the position and orientation of SoxS binding sites in the transcriptional activation of the class I subset of *Escherichia coli* superoxide-inducible promoters. *Mol Microbiol* **34**: 414-430.
- Wu M, Schleif R.** 2001a. Strengthened arm-dimerization domain interactions in AraC. *J Biol Chem* **276**: 2562-2564.
- Wu M, Schleif R.** 2001b. Mapping arm-DNA-binding domain interactions in AraC. *J Mol Biol* **307**: 1001-1009.
- Yoshida S, Sasakawa C.** 2003. Exploiting host microtubule dynamics: a new aspect of bacterial invasion. *Trends Microbiol* **11**: 139-143.
- Yu RR, DiRita VJ.** 1999. Analysis of an autoregulatory loop controlling ToxT, cholera toxin, and Toxin-Coregulated Pilus production in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **181**: 2584–2592.
- Yu RR, DiRita VJ.** 2002. Regulation of gene expression in *Vibrio cholerae* by ToxT involves both antirepression and RNA polymerase stimulation. *Mol Microbiol* **43**: 119-134.
- Zhang WL, Kohler B, Oswald E, Beutin L, Karch H, Morabito S, Caprioli A, Suerbaum S, Schmidt H.** 2002. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* **40**: 4486-4492.

Zhou Y, Kolb A, Busby SJW, Wang YP. 2014. Spacing requirements for Class I transcription activation in bacteria are set by promoter elements. *Nucleic Acids Res* **42**: 9209-16.

XIV. APÉNDICES

APÉNDICE I



Alineamiento de proteínas de la familia AraC/XylS. Las líneas en color señalan los dominios N (azul) y C (rosa), la región conectora (verde) y los motivos HTH1 (morado) y HTH2 (café). Encima del alineamiento se muestra la estructura secundaria de PerA; en recuadros las mutaciones que se han realizado en PerA.

APÉNDICE II

Further Characterization of Functional Domains of PerA, Role of Amino and Carboxy Terminal Domains in DNA Binding

J. Antonio Ibarra^{1*}^{‡a}, Claudia M. García-Zacarias^{2,3}, Cristina Lara-Ochoa^{1,2,3}, Alejandro Carabarin-Lima^{2,3b}, J. Sergio Tecpanecatl-Xihuitl², Ernesto Perez-Rueda³, Ygnacio Martínez-Laguna², José L. Puente^{1*}

1 Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, **2** Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México, **3** Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

Abstract

PerA is a key regulator of virulence genes in enteropathogenic *E. coli*. PerA is a member of the AraC/XylS family of transcriptional regulators that directly regulates the expression of the *bfp* and *per* operons in response to different environmental cues. Here, we characterized mutants in both the amino (NTD) and carboxy (CTD) terminal domains of PerA that affect its ability to activate the expression of the *bfp* and *per* promoters. Mutants at residues predicted to be important for DNA binding within the CTD had a significant defect in their ability to bind to the regulatory regions of the *bfp* and *per* operons and, consequently, in transcriptional activation. Notably, mutants in specific NTD residues were also impaired to bind to DNA suggesting that this domain is involved in structuring the protein for correct DNA recognition. Mutations in residues E116 and D168, located in the vicinity of the putative linker region, significantly affected the activation of the *perA* promoter, without affecting PerA binding to the *per* or *bfp* regulatory sequences. Overall these results provide additional evidence of the importance of the N-terminal domain in PerA activity and suggest that the activation of these promoters involves differential interactions with the transcriptional machinery. This study further contributes to the characterization of the functional domains of PerA by identifying critical residues involved in DNA binding, differential promoter activation and, potentially, in the possible response to environmental cues.

Citation: Ibarra JA, García-Zacarias CM, Lara-Ochoa C, Carabarin-Lima A, Tecpanecatl-Xihuitl JS, et al. (2013) Further Characterization of Functional Domains of PerA, Role of Amino and Carboxy Terminal Domains in DNA Binding. PLoS ONE 8(2): e56977. doi:10.1371/journal.pone.0056977

Editor: Brian Stevenson, University of Kentucky College of Medicine, United States of America

Received: September 22, 2012; **Accepted:** January 16, 2013; **Published:** February 25, 2013

Copyright: © 2013 Ibarra et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, www.conacyt.gob.mx) (60796 and 154287 to JLP and 36477-N to YML), and from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, www.http://dgapa.unam.mx/) (IN227410 to JLP and IN-209511 for EPR). JAI, CLO and ACL were supported by fellowships from CONACyT (86036, 165332 and 180540 respectively). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: puente@ibt.unam.mx (JLP); ibarraj@usf.edu (JAI)

^{‡a} Current address: Department of Cell Biology, Microbiology and Molecular Biology, University of South Florida, Tampa, Florida, United States of America

^{‡b} Current address: Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., México DF, México

¶ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a common cause of acute diarrhea mainly in infants living in developing countries [1,2]. EPEC interaction with intestinal epithelial cells differs from that observed in other bacteria like *Salmonella* or *Shigella*, as EPEC is not an invasive pathogen. This interaction involves a complex series of events that for research purposes has been divided in three stages. The first stage is the colonization process during which localized adherence occurs, a phenotype considered to be a common property of the typical EPEC [1,3,4]. In the second stage a cohort of bacterial effectors is translocated into the host cell cytoplasm using a type III secretion system (T3SS) encoded by the Locus of Enterocyte Effacement (LEE) [5]. Translocated effectors include Tir (Translocated intimin receptor), which upon its translocation is inserted into the host cell membrane. The third

phase is characterized by the intimate association of the bacteria with the host cell membrane, which is mediated by the interaction of the outer membrane protein intimin with Tir. These events lead to the generation of the attaching and effacing (A/E) lesion, characterized by the dissolution of the intestinal brush border and loss of epithelial microvilli (effacement) at the sites of bacterial attachment and by the formation of actin-rich pedestal-like structures underneath the adherent bacteria [6].

Localized adherence is associated with the production of a type 4 fimbriae known as the bundle-forming pilus (BFP) [7]. BFP has been shown to have an essential role during human infection [8] and as an adherence factor *in vitro* [9]. The proteins responsible for the biogenesis of the BFP filament are encoded by the 14-gene *bfp* operon located in the EPEC adherence factor (EAF) plasmid or pEAF [10,11]. The BFP structural subunit is encoded by *bfpA*, the first gene of the *bfp* operon [12,13]. The *bfp* genes are expressed

from a promoter located upstream of *bfpA* during the exponential phase of growth at 37°C in tissue culture medium and are negatively modulated by ammonium and by temperatures below or above 37°C [14,15].

The transcriptional activation of *bfp* requires the product of the *perA* gene, the first gene of the *per* operon localized 18 kb downstream of *bfpA* in pEAF [16,17]. *perA* encodes a 274 amino acids protein that belongs to the AraC/XylS family of transcriptional regulators and has been shown to be an essential virulence regulator for EPEC in the human host [8]. Frameshift mutations in the *perA* gene of typical EPEC clinical isolates were associated to a reduction in adherence and BFP expression [18,19].

The closest homologues of PerA (also known as BfpT), such as Rns, CfaR, CsrR, FapR, FasH and AggR, are all positive regulators of fimbrial expression in different *E. coli* pathogens (reviewed in [20,21]). PerA controls its own expression by an autoregulatory mechanism that responds to the same signals as those previously described for *bfpA* [22]. Activation of the *per* operon also allows the expression of *perC*, encoding a protein with no evident similarity to other proteins in the data bases, which has been shown to specifically activate the promoter of the *LEE1* operon and thus of *ler*, the gene encoding the master regulator (Ler) of LEE gene expression in A/E pathogens [5,23,24,25]. Altogether, these observations confirm the relevance of PerA in the regulatory network of virulence genes in EPEC.

The AraC/XylS family of bacterial regulators consists of more than 1500 different proteins [21,26], which regulate a wide range of cellular processes like carbon and nitrogen metabolism, adaptation to environmental changes, stress response, and virulence [20,21,26]. Most of these proteins are composed of two structural domains: a conserved DNA binding domain (DBD), usually situated at the C-terminal domain (CTD), that contains two putative α -helix-turn- α -helix (HTH) motifs shown in some members to be involved in DNA binding and in interactions with the RNA polymerase (RNAP); and a non-conserved N-terminal domain (NTD) that is in many cases required for self-dimerization and effector molecule-binding [20,21,26]. In addition to be the most variable region amongst the AraC/XylS family members, the NTD is in some cases absent (*i.e.* SoxS and MarA). PerA is composed of both domains, but has been shown to function as a monomer, in contrast to most members of the AraC/XylS family [24,27]. This protein binds to a 29-bp-long AT-rich consensus motif at the *bfpA* and *perA* regulatory regions, which is located at different distances from the -35 promoter hexamer [27]. PerA is phylogenetically more related to the subfamily of AraC/XylS-like proteins regulating virulence gene expression [20,21,26].

In order to further characterize the role that the NTD and CTD domains play in PerA function, here we introduced different point mutations and deletions in both domains and studied their effect in promoter activation *in vivo* and in DNA binding. As predicted, mutations at the HTH1 and HTH2 motifs caused a significant negative effect in PerA function and DNA binding. Interestingly, specific mutations at the NTD also had a detrimental effect on PerA activity, which in most cases also correlated with a defect in DNA binding. Moreover, mutations at residues near the linker region affected differentially the activation of the PerA-dependent promoters or generated variants that were less responsive to the presence of ammonium in the growth medium. Our results further sustain the importance of both the CTD and NTD domains of PerA on promoter activation by demonstrating their role in DNA recognition. Our results also suggest additional roles for these domains such as their putative involvement in the response to environmental signals and promoter activation, but also suggest

that within these domains PerA contains a sequence motif that may be involved in the response to environmental signals and differential promoter activation.

Materials and Methods

Bacterial Strains and Growth Conditions

The strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Luria-Bertani (LB) broth [28] or Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) without sodium pyruvate, containing 0.45% (w/v) glucose and L-glutamine (584 mg/l) (Gibco BRL Life Technologies) and supplemented with 1% LB (v/v), were used for growth of cultures at 37°C. When indicated the medium was supplemented with 20 μ M ammonium sulfate (Sigma). When necessary, 100 μ g/ml ampicillin or 25 μ g/ml kanamycin (Sigma) were added to the media.

CAT Assay

The CAT assay was performed as described previously [15]. Briefly, bacteria from an overnight culture grown in LB with antibiotics at 37°C were centrifuged and resuspended in phosphate buffered saline (PBS) solution, pH 7.4, to an OD₆₀₀ of 1.0. A 1:50 dilution of the bacterial suspension was done in 50 ml of fresh LB or DMEM and then incubated in a shaking water bath at 210 r.p.m. (Gyromax 902, Amerex Instruments) at 37°C. Samples were collected every hour in order to determine the OD₆₀₀. At OD₆₀₀ = 1.0 or 1.4, one ml samples were taken to determine chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity. Whole cells pellets were collected by centrifuging (16,000 \times g) and then washed with 1 ml of DL-dithiothreitol (DTT) buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, and 30 mM DTT). The bacterial pellet was resuspended in 500 μ l of DTT buffer and sonicated on ice. Intact cells and debris were eliminated by centrifugation at 16,000 \times g for 20 min, and the supernatants were transferred to clean 1 ml microfuge tubes. For determination of CAT activity, 5 μ l of each extract were added in duplicate to a 96-well flat-bottom ELISA plate (Corning), followed by 200 μ l of reaction mixture containing 1 mM DNTB (5,5'-dithio-bis[2-nitrobenzoic acid] (Research Organics), 0.1 mM acetyl-CoA (Pharmacia) and 0.1 mM chloramphenicol (Sigma) in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8. Changes in absorbance at 410 nm were recorded every 5 sec for 3 min, using a scanning auto reader and microplate workstation, Ceres 900 C and the KC3 Jr. software (Bio-Tek Instruments) set in the kinetic mode. The activities were obtained by interpolation from a standard curve, generated with purified CAT enzyme (Sigma Chemicals) at concentrations ranging from 0 to 2500 U/ μ l.

The protein concentration of the cell extracts used in the CAT assay was determined using the BCA protein assay kit (Pierce). Bovine serum albumin (BSA) served as the protein standard. Each given value represents the average activity obtained from at least three independent experiments.

DNA Manipulations

All DNA manipulations were performed using standard genetic and molecular techniques [28]. Plasmid DNA was purified using the High Pure DNA kit (Roche Scientific Inc.) following the manufacturer's protocol. Restriction and DNA-modifying enzymes were obtained from Roche, New England Biolabs (NEB) or Invitrogen and used according to the manufacturer's instructions. The oligonucleotides used for amplification by PCR were synthesized at our institute's oligonucleotide synthesis facility. Oligonucleotide primer sequences are available upon request. PCR reactions were

Table 1. Strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Relevant characteristics *	Source or reference
<i>Strains</i>		
B171-8	Wild-type EPEC O111:H ⁻	[15]
B171-10	EAF plasmid-cured derivative of B171-8	[15]
MC4100	F- <i>araD139 (argF-lac)U169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbcR</i>	Laboratory strain
BL21/pLysS	$\Delta ompT$ (<i>lon hsdS_B (r_B m_B) gal dcm</i> (Δ DE3) pLysS (Cm ^R)	Invitrogen
<i>Plasmids</i>		
pCS-T	pACYC184 derivative carrying <i>perA</i> (<i>bfpT</i>)	[22]
pCS-T138A	pCS-T derivative with a I138A change that inserts a HindIII restriction site. SDM	This work
pCST _{K14A}	pCS-T derivative carrying PerA _{K14A} . SDM	This work
pCST _{Y26A}	pCS-T derivative carrying PerA _{Y26A} . SDM.	This work
pK3-mut-PerA _{Y29A}	pCS-T derivative containing PerA _{Y29A} SDM	This work
pK3-mut-PerA _{Q40R}	pCS-T derivative containing PerA _{Q40R} SDM	This work
pK3-mut-PerA _{D100A}	pCS-T derivative containing PerA _{D100A} SDM	This work
pK3-mut-PerA _{D101A}	pCS-T derivative containing PerA _{D101A} SDM	This work
pK3-mut-PerA _{E116A}	pCS-T derivative containing PerA _{E116A} SDM	This work
pCST _{S194A}	pCS-T derivative carrying PerA _{S194A} . SDM.	This work
pCST _{R199G}	pCST derivative carrying PerA _{R199G} . SDM.	This work
pCST _{K249M-Y255A}	pCS-T138A derivative carrying PerA _{K249M-Y255A} . OE-PCR	This work
pCST _{Y255A}	pCS-T138A derivative carrying PerA _{Y255A} . OE-PCR	This work
pCST _{P259A}	pCS-T138A derivative carrying PerA _{P259A} . OE-PCR	This work
pCST _{K260STOP}	pCS-T138A derivative carrying a <i>perA</i> with an stop codon in position 259. OE-PCR	This work
pAIT _{Δ30-49}	pCS-T derivative carrying a deletion in PerA from amino acid residues 30 to 49. R-PCR	[27]
pAIT _{Δ70-102}	pCS-T derivative carrying a deletion in PerA from amino acid residues 70 to 90. R-PCR	This work
pAIT _{Δ90-176}	pCS-T derivative carrying a deletion in PerA from amino acid residues 90 to 176. R-PCR	This work
pK3-mut-PerA _{D168A}	pCS-T derivative containing PerA _{D168A} SDM	This work
pK3-mut-PerA _{D177A}	pCS-T derivative containing PerA _{D177A} SDM	This work
pK3-mut-PerA _{E234A}	pCS-T derivative containing PerA _{E234A} SDM	This work
pCAT201	pKK232-8 derivative containing the <i>bfpA-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -201 to +76	[15]
pUST166	pKK232-8 derivative containing the <i>perA-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -155 to +21	[22]
pMalC2xa	Vector for constructing MBP fusions	New England Biolabs
pMALT2	pMalC2xa derivative expressing wild type MBP-PerA	[27]
pMAL-PerA _{S194A}	pMalC2xa derivative expressing MBP-PerA _{S194A}	This work
pMAL-PerA _{R199G}	pMalC2xa derivative expressing MBP-PerA _{R199G}	This work
pMAL-PerA _{K249M-Y255A}	pMalC2xa derivative expressing MBP-PerA _{K249M-Y255A}	This work
pMAL-PerA _{P259A}	pMalC2xa derivative expressing MBP-PerA _{P259A}	This work
pMAL-PerA _{D100A}	pMalC2xa derivative expressing MBP-PerA _{D100A}	This work
pMAL-PerA _{D101A}	pMalC2xa derivative expressing MBP-PerA _{D101A}	This work
pMAL-PerA _{E116A}	pMalC2xa derivative expressing MBP-PerA _{E116A}	This work
pMAL-PerA _{D168A}	pMalC2xa derivative expressing MBP-PerA _{D168A}	This work
pMAL-PerA _{E234A}	pMalC2xa derivative expressing MBP-PerA _{E234A}	This work

*Indicates how the mutant was obtained: SDM, site directed mutagenesis; OE-PCR, overlapping extending PCR; R-PCR, reverse PCR.
doi:10.1371/journal.pone.0056977.t001

performed in a 100 μ l volume using AmpliTaq polymerase (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Double-stranded DNA sequencing of the *perA* mutants was done with the dideoxy-chain termination procedure, using a Thermo Sequenase cycle sequencing kit according to the manufacturer's instructions (Amersham).

Plasmids for the expression of mutant versions of the chimeric protein MBP-PerA fusions were constructed as previously described [27]. Briefly, the *perA* gene (GenBank: AB523702.1) was PCR amplified from plasmid pCS-T using oligonucleotides BFPT-BHI-Fw (5'-GGTTAATGCTTGGATCCAAAAAAG-3') and TAFB-2862R (5'-TTGTTCTGCAGTTCGAGTGCTC-3') that introduced BamHI and PstI restriction sites (underlined)

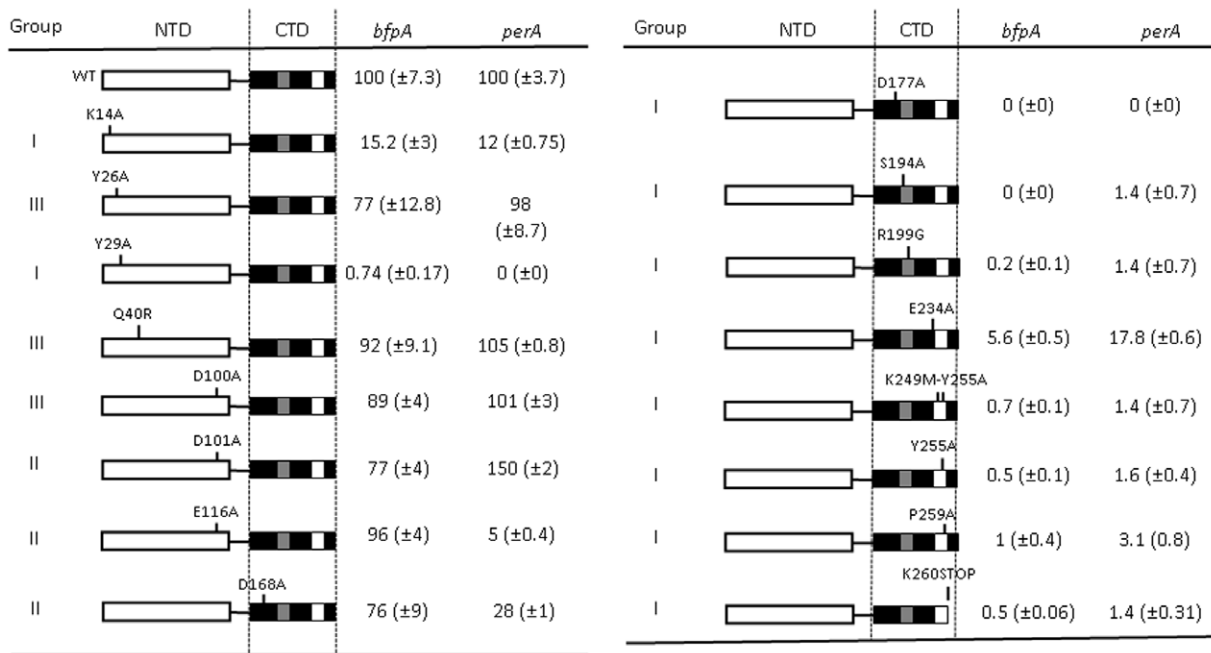


Figure 2. NTD and CTD mutations in PerA affect its activator function. Plasmids encoding the mutated versions of *perA* were transformed into EPEC B171-10 strain and bacteria were grown in DMEM at 37°C to $OD_{600} = 1.4$. One ml samples were taken to prepare cell extracts and determination of CAT activity. Data are expressed as a percentage of expression compared to that obtained with the wild type protein (wt) for each fusion. Mutants were clustered in three groups according to their phenotypes: I, severely affected (<15% of activity); II, moderately affected (>15% to <75% of activity) but able to activate only one of the fusions or that have an apposite effect on promoter activation; and III, not affected or similar to wt (>75% of activity). Values are the mean of three independent assays. Standard deviations (\pm SD) are shown in parenthesis. doi:10.1371/journal.pone.0056977.g002

respectively. Fragments were cloned in frame at the 3' end of the maltose binding protein (*malE*) gene in pMALC2xa vector (NEB) using the BamHI and PstI sites. All constructs were sequenced and induced proteins (except for PerA_{260STOP}) were detected by Western blot with a specific antibody directed to the last 16 amino acids of PerA (data not shown) [27].

Mutagenesis of *perA*

PerA mutagenesis was carried out by one of three different methods: 1) using site-directed mutagenesis (SDM) using a Quick Change kit (Stratagene); 2) by overlap-extended PCR (OE-PCR), as previously described [29]; or 3) by reversed PCR (R-PCR). pCS-T plasmid was used as template (Table 1). Oligonucleotide primer sequences are available upon request.

Quick Change kit for SDM mutagenesis was used according to the manufacturer's protocol (Stratagene). OE-PCR was done as previously described [29]. Briefly, to facilitate the generation of mutants at the C-terminal domain, plasmid pCS-T138A was generated by designing oligonucleotides with a HindIII site in the sequence corresponding to I138 changing this residue for alanine (I138A). The SacI restriction site in plasmid pCS-T was used and a HindIII restriction site at residue I138 in the putative linker of *perA* was inserted, generating the I138A mutation (plasmid pCS-T138A, Table 1). The activity of the PerA_{I138A} mutant was analyzed in EPEC B171-10 carrying the *bfpA* or *perA* transcriptional fusions and showed no significant difference was observed in the activation of both promoters with respect to the wild type (wt) protein (data not shown). The mutagenic strategy to generate alanine substitutions at the C-terminal domain required four primers and two subsequent rounds of PCR reactions for each mutant. In the first round, two PCR reactions using pCS-T138A as template were performed one with a primer containing the HindIII site and the second primer with

the mutation in the selected residue; and the other with the complementing mutated primer and the primer containing the SacI site downstream of the 3' end of the gene. The products of both reactions were purified and treated with T4 DNA polymerase (NEB) to generate blunt ends. The resulting PCR products containing overlapping regions of 47 bp were mixed for an additional round of 5–7 PCR extending cycles. Finally, the two flanking primers containing the HindIII and the SacI sites were added to this reaction for another 25 PCR cycles to amplify the overlapping product. Products of expected size were extracted from agarose gels with GeneClean kit (BIO 101 System), digested with HindIII and SacI and cloned into previously digested pCS-T138A DNA. This last step reconstituted the full *perA* gene but now containing one of the C-terminal mutations.

R-PCR mutagenesis was done as follows: oligonucleotides were designed to generate in-frame deletions of different codon tracks of the *perA* structural gene and the insertion of a BglII restriction site using pCS-T as template. DNA fragments were gel purified, digested with BglII and ligated. Selected clones were verified by restriction profile and then sequenced. PerA derivatives were detected by Western blot (except for PerA_{D101A} and PerA_{260STOP}) were detected by Western blot with a specific antibodies directed to the last 16 amino acids of the protein (Figure S1) [27].

Expression and Purification of MBP-PerA Proteins

Expression and purification of the MBP-PerA fusions was conducted as described previously [27]. Briefly, *E. coli* strain BL21/pLysS was transformed with pMALT2 or its derivatives (Table 1) and grown in LB medium supplemented with 0.2% (w/v) glucose, 100 μ g/ml ampicillin and 30 μ g/ml chloramphenicol at 30°C in an agitated water bath. The expression of recombinant

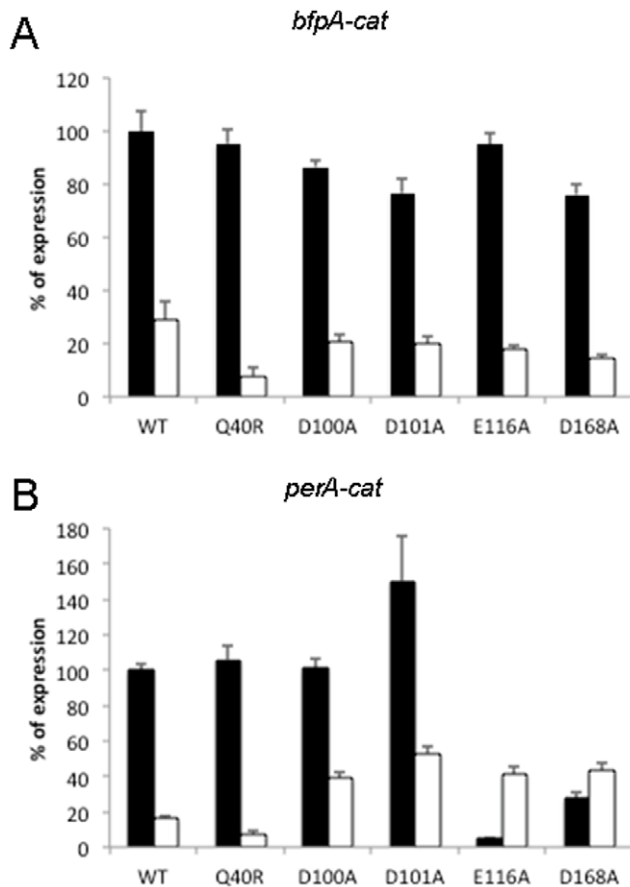


Figure 3. Mutations in the PerA NTD overcome or enhance ammonium repression. EPEC strain B171-10 was transformed with either *bfpA-cat* or *perA-cat* fusions and complemented with plasmids encoding either wild type (wt) or mutated proteins. Bacteria were grown in DMEM at 37°C with (white bars) or without (black bars) ammonium sulfate. CAT specific activity was determined from bacterial cultures grown to an OD₆₀₀ of 1.0. Data are expressed as a percentage of expression compared to that obtained with the wild type protein (wt) for each fusion. The results are the mean of three independent experiments and error bars represent the standard deviation. doi:10.1371/journal.pone.0056977.g003

protein was induced by addition of 0.3 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma) when the culture reached an OD₆₀₀ of 0.5 to 0.7. Growth continued for another 3 h at 30°C. Bacteria were collected by centrifugation at 4°C, and the pellet was washed once with ice-cold column buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol) and concentrated 100-fold with the same buffer. Cells were frozen and sonicated in ice by five 30-sec pulses with 30-sec resting cycles. Crude extract was obtained by centrifugation at 14,000 \times g for 30 min at 4°C. MBP-PerA proteins were bound to an amylose resin column equilibrated with column buffer at room temperature and eluted with the same buffer but supplemented with 10 mM maltose (Sigma Chemicals). The concentration of the purified protein was determined by the method of Bradford and analyzed by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

EMSAs

Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were carried out as described before [27]. Briefly, PCR-amplified DNA fragments

were incubated in binding buffer [25 mM HEPES pH 7.9, 40 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA, 5% (v/v) glycerol] at room temperature for 20 min with different concentrations of MBP-PerA in a final volume of 20 to 30 μ l. Samples were loaded onto 0.25X Tris-borate-EDTA (TBE) native 6% acrylamide gels and run at 120 V at room temperature. Positive controls were those used in our previous study [27] and included DNA fragments from the *perA* and *bfpA* promoter regions. Negative controls were either a region upstream of the *bfpA* PerA binding site [27] or the *perA* coding region (data not shown). Gels were stained with ethidium bromide and visualized with an Alpha-Imager UV transilluminator (Alpha Innotech).

PerA CTD Structural Modeling

A computational model of the three-dimensional structure of PerA (P43459) was built with the CPHmodels 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels>) [30]. After an initial search, CPHmodels defined the *E. coli* transcriptional factor Rob (PDB entry 1D5Y chain A) as the best hit to be used as a template. These two proteins share 27% of identity (data not shown). In order to refine the model, this was minimized by using the Gromacs server (<http://lorentz.immstr.pasteur.fr/gromacs>) [31]. Finally, the RAMPAGE program (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/rapper>) was used to validate the stereochemical quality of the resulting three-dimensional model [32]. After analyzing the Ramachandran plot, 98.2% of the residues were located in allowed regions. All the bond distances, angles and dihedrals fulfill the normal limits for polypeptide chains. The resulting model includes 112 of the 274 residues at the carboxyl terminus of PerA. Finally, the structure was displayed in ribbon by using Pymol program.

Results

Mutations at the NTD Affect the Activation Function of PerA

In order to further characterize the functional role of the N-terminal domain (NTD) in PerA, we first defined the two domains in this protein by using Pspired [33]. NTD was delimited from residues 1–160 and the CTD from residues 163–274 with a possible short linker between residues 161 and 163 (Figure 1). Then, by using ClustalW2 [34], we aligned the PerA amino acid sequence with that of other virulence related AraC-like regulators such as *Shigella flexneri* VirF (VirF_{Sh}), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) CfaD, FapR and Rns and *Vibrio cholerae* ToxT (Figure 1). With this information, amino acid residues were selected for site-directed mutagenesis depending on their location and level of conservation with the above mentioned AraC/XylS-like regulators. Here is a brief description of those selected for this study: Residues K14 and Y26 are well conserved in all the other virulence regulators (Figure 1). Residues Y29 is not conserved but located in the same β -strand as Y26, while Q40 is also a not conserved residue located near the β 1-loop- β 2 containing residue G37 that was previously shown to be required for PerA activity [24]. Residues D100, D101, and E116 are not conserved at the same positions in the other AraC-like proteins and were selected for analysis because in XylS a similar (D) residue located close to this region have been shown to interact with subunits of the RNA polymerase [35,36]. In addition, we also wanted to learn whether elimination of segments at the NTD would affect protein function as activator. Mutants with deletions in three different segments containing putative α -helices or β -sheets in this domain were constructed (Δ 30–49, Δ 70–102 and Δ 90–176, this latter construct also deleted the first α -helix of the CTD). Except for mutant Q40R, all changes at the NTD were alanine substitutions.

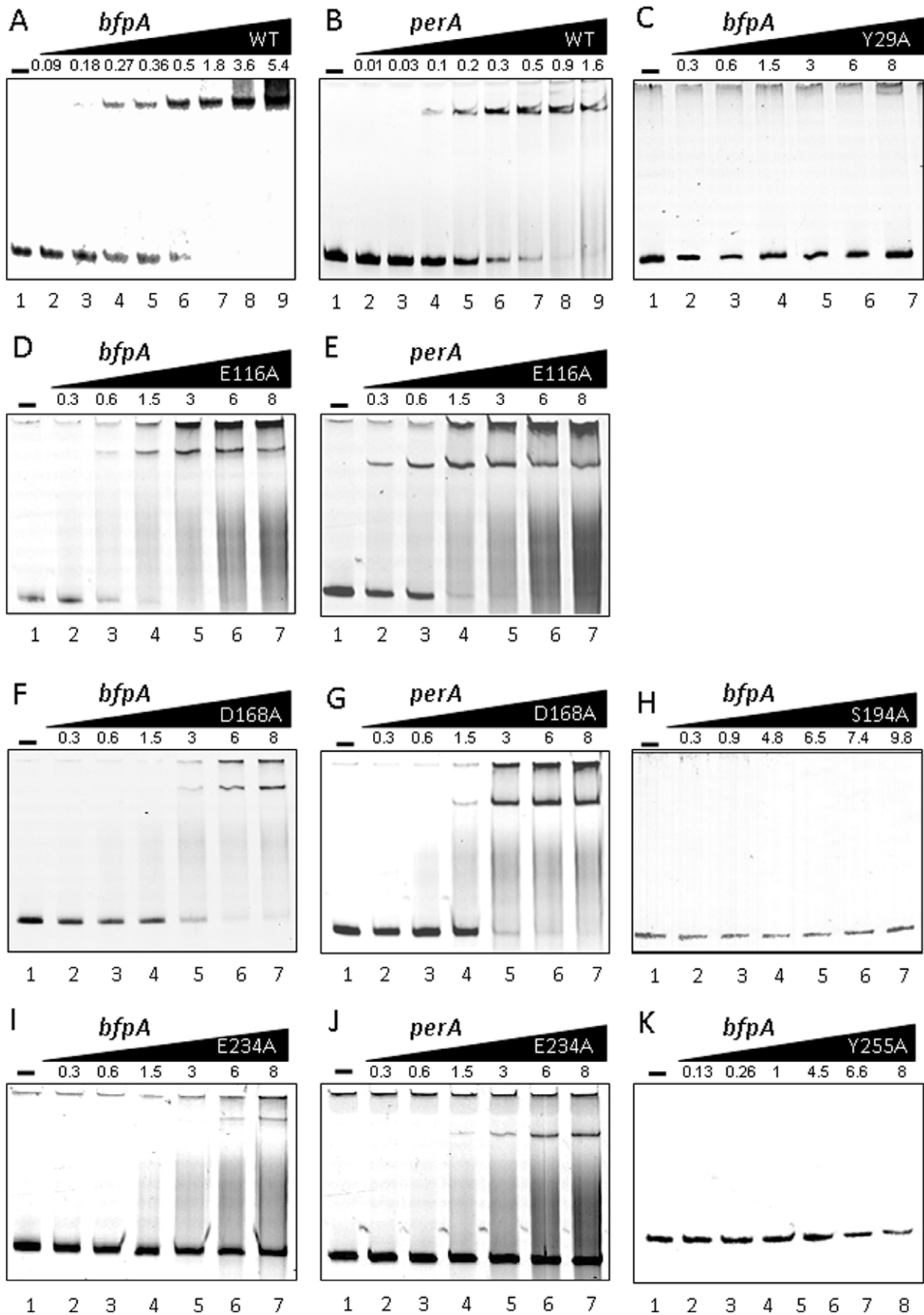


Figure 4. DNA binding of different PerA mutants. EMSA experiments with wild type (A and B) and mutated MBP-PerA fusions (C–K) showing the interaction with DNA fragments spanning either the *bfpA* or *perA* promoter regions (indicated above each panel). Increasing amounts in μM concentrations of each protein were used as indicated above each individual gel. Free DNA and protein-DNA complexes were resolved in 6% polyacrylamide gel electrophoresis at 120 V in 0.25X TBE gels and stained with ethidium bromide. For presentation purposes the color of all images was inverted from the original image. A similar result was obtained for the *perA* promoter region with mutants PerA_{Y29A}, PerA_{S194A} and PerA_{Y255A} (data not shown).
doi:10.1371/journal.pone.0056977.g004

Plasmids encoding the different *perA* variants (Table 1) were transformed into the pEAF-cured EPEC strain B171-10 to complement the expression of the *bfpA-cat* or the *perA-cat* fusions. The resulting strains were grown in DMEM at 37°C. The mutations tested had a variety of effects on PerA activity and according to their phenotype were clustered into three groups (Figure 2 and data not shown). Group I includes PerA mutants which function was drastically affected (PerA_{Y29A}, PerA_{Δ30–49}, PerA_{Δ70–102} and PerA_{Δ90–176}) or that showed only residual activity for both the *bfpA* and *perA* promoters (PerA_{K14A}). Group II includes PerA mutants able to activate only one of the fusions or that have an opposite effect on promoter activation. For instance the PerA_{E116A} mutant was severely affected for the activation of the *perA* promoter, but not of the *bfpA* promoter, while mutant PerA_{D101A} showed a slight reduction on its ability to activate the *bfpA* promoter, it also showed a 50% increase activation of the *perA* promoter. Group III includes variants carrying mutations with no or slight effect when compared with wild type PerA (PerA_{Y26A}, PerA_{Q40R} and PerA_{D100A}). Altogether, these data further demonstrate that the integrity of the NTD and specific amino acid residues are required for PerA-mediated transcriptional activation and, interestingly, provide evidence that the NTD is also important during promoter recognition and in the differential activation of both promoters.

Both HTH Motifs in the CTD are Important for PerA Activator Function

In addition to previously identified residues in the CTD [24], here we identified additional critical residues in this domain by mutating previously uncharacterized amino acids of the first connecting loop (D177, between $\alpha 1$ and $\alpha 2$), in the two HTH motifs (HTH1 residues S194 and R199, and HTH2 residues E234, K249, Y255) and in the last α -helix ($\alpha 7$) P259 (Figure 1). Additionally, residue K260 was replaced by an ochre stop codon immediately after the well-conserved P259 residue generating PerA_{K260STOP}, hence eliminating most of the last α -helix terminal region ($\alpha 7$, residues 260–274). In addition, the previously characterized residues D168, located at the first α -helix in this region, and E234, located at the HTH2 [24], were also selected for further evaluation (Figure 1).

As for the NTD mutants, the CTD variants were tested for their ability to activate the *bfp-cat* and *perA-cat* fusions in EPEC B171-10. As shown in Fig. 2, most CTD mutants at residues within or near the DNA facing helices in the HTH1 or the HTH2 motifs were unable to activate the reporter fusions (group I mutants), suggesting a defect in DNA binding, except for mutant PerA_{E234A} which was still weakly active for both promoters consistently with a previous report [24]. PerA_{D168A} mutant, located at the first CTD

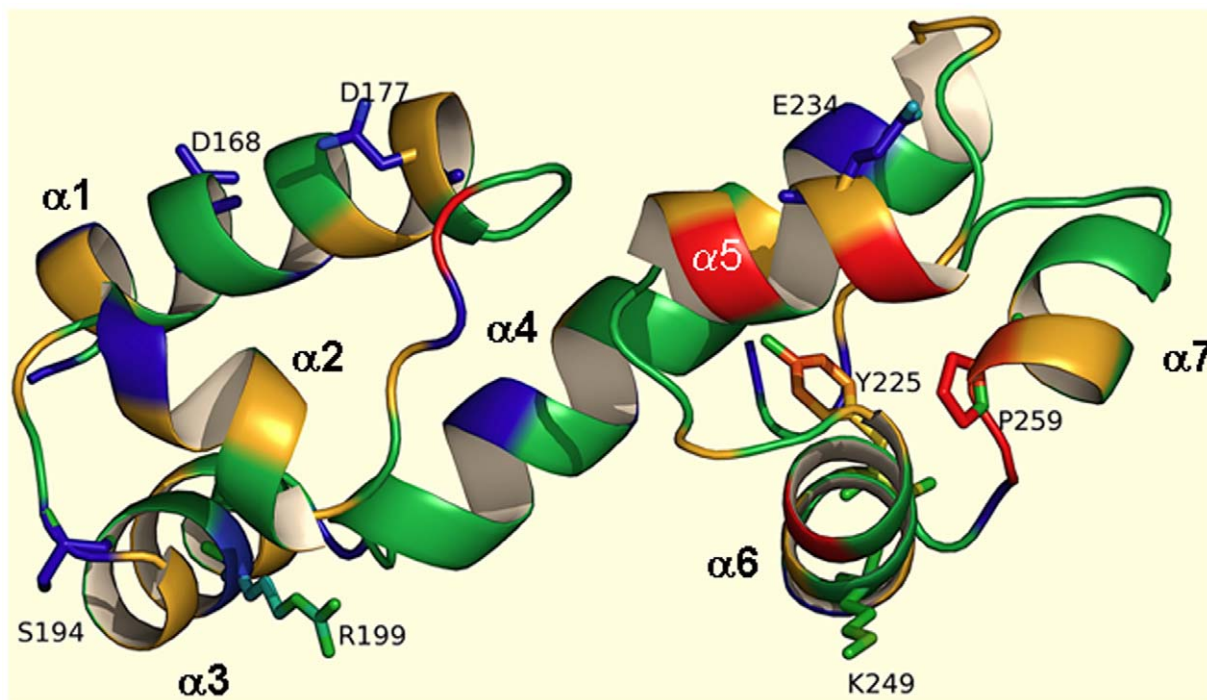


Figure 5. Mapping of mutations in PerA CTD. Ribbon-type model of PerA CTD predicted molecular structure, including the HTH DNA binding domain obtained with CPHmodels 3.0 (see *Materials and Methods* section) and using the Rob structure as a template. The CTD is composed of seven α -helices ($\alpha 1$ to $\alpha 7$) comprising two HTH motifs ($\alpha 2$ -turn- $\alpha 3$ for HTH1 and $\alpha 5$ -turn- $\alpha 6$ for HTH2) connected by a linker α -helix structure ($\alpha 4$) and two flanking α -helices ($\alpha 1$ and $\alpha 7$). Mutated residues D168, D177, S194, R199, Y225, E234, K249 and P259 are indicated and highlighted as sticks structures. Alpha helices (α) correspond to those shown in Figure 1.
doi:10.1371/journal.pone.0056977.g005

α -helix, showed a differential phenotype (group II mutants) being highly defective in the activation of the *perA* promoter, but only slightly diminished the activation of the *bfpA* promoter. In contrast, it was previously shown that this mutant activated a *perA-lacZ* transcriptional fusion as the wild type PerA, although was not tested for the *bfpA* promoter [24]. It is possible that the difference in results is due to the reporter gene used in each case. As for mutants PerA_{D101A} and PerA_{E116A}, D168 seems to play a role in discriminating between the two promoters (see above). Finally, deletion of the last 15 amino acids (PerA_{K260STOP}) also abolished the activity of the protein, suggesting that this segment plays a role either in PerA stability or in maintaining the adequate folding of the DNA binding domain (DBD). All mutants were expressed and stable as wild type PerA, as shown by western blot using an antibody directed to the last 16 amino acids of PerA [27] (Figure S1 and data not shown). PerA_{K260STOP} could not be detected because it lacks the C-terminal residues recognized by the antibody. These results further support the notion that highly conserved residues at the HTH motifs are critical for the transcriptional activation function of PerA, as for other AraC-like proteins.

PerA amino acid residues involved in environmental regulation. The expression of pEAF-encoded *bfp* and *per* genes is repressed in the presence of ammonium salts in the culture medium at 37°C [15,22]. In order to evaluate if any of the residues analyzed in this work is involved in sensing directly or indirectly environmental signals such as ammonium salts, we determined whether group II or III PerA mutants (PerA_{Y26A}, PerA_{Q40R}, PerA_{D100A}, PerA_{D101A}, PerA_{E116A} and PerA_{D168A}) were able to overcome the repressing conditions generated by ammonium salts. Despite the fact that none of the mutants was able to overcome completely the negative regulation imposed by the addition of ammonium salts some of them showed interesting phenotypes. PerA_{D100A} and PerA_{D101A} were able to slightly overcome this negative regulation but only for the activation of the *perA* promoter (Figure 3B). Notably, PerA_{E116A} showed an interesting behavior in the presence of ammonium salts, while being repressed for the activation of *bfpA* (Figure 3A), its activity was partially restored for the activation of *perA* (Fig. 3B). PerA_{D168A} was able to activate partially *perA* and this activation was insensitive to ammonium repression. As with wt PerA, activation of both promoters was still repressed in the presence of ammonium for mutants PerA_{Y26A} and PerA_{Q40R} (data not shown). These results indicate that PerA also contains residues that may play a role in sensing environmental conditions, such as the presence of ammonium salts in the medium, which have a negative effect in PerA activity. Moreover, these data further support the notion that the interaction of PerA with both promoters is different.

Residues in both NTD and CTD have a Role in PerA DNA Binding Ability

PerA acts as an activator of the *bfp* and *per* operons by binding to their promoter regions [27] possibly by eliminating H-NS negative regulation [24]. Based on the secondary and tertiary structures of PerA (Figure 1), it is predicted that some of the defective mutants described above, in particular those containing mutations at the HTH motifs (specially those possibly facing the DNA in helices α 3 and α 6), would be affected in their ability to interact with DNA. We had successfully purified a functional fusion to the maltose binding protein (MBP) and used it to determine the PerA binding sites at both the *bfpA* and *perA* promoters [27]. Here we used the same strategy to test the DNA binding activity of different mutants.

Selected mutants were fused in-frame to the gene encoding the MBP and the resulting constructs were used to over-express them. Upon purification, their DNA binding ability was tested by electrophoretic mobility shift assays (EMSA) using increasing concentrations of the purified MBP-PerA fusion proteins and DNA fragments spanning the promoter regions of *bfpA* (positions -214 to -15 with respect to the transcriptional start site) and of *perA* (positions -155 to +21) (Figure 4). Similarly to previous results from our laboratories [27], we observed a single band shifted by MBP-PerA for both promoters, which correlates with its putative monomeric nature (Figure 4A and 4B). This contrast with the result obtained by Porter *et al.* [24] where they observed two shifted bands, it is possible that the difference is due to tag used in each case. The MBP-PerA_{Y29A} was not able to bind to any of the two promoter regions tested (Figure 4C), consistently with their observed inability to activate both transcriptional fusions (Figure 2), indicating that the NTD plays a role in DNA binding.

PerA_{E116A} mutant interacted with both promoter fragments in a similar fashion as that observed with the wt protein (Figure 4D and 4E) despite the fact that it was defective for *perA* activation, but not for the activation of *bfpA* (Figure 2). PerA_{D168A} was also able to bind to both promoters although with slightly less affinity than the wt (4F and 4G). This mutant also showed a differential activation for *bfpA* and *perA* (Figure 2). These results indicate that these residues are not involved in DNA recognition (as for E116A) or may have a slight defect in it (as for D168A) and therefore they may have other roles that affect PerA regulatory activity.

Mutations in regions HTH1 (PerA_{S194A}, PerA_{D177A} and PerA_{R199G}), HTH2 (PerA_{K249M-Y255A}, and PerA_{Y255A}) and α 7 (PerA_{P259A}) abolished the DNA binding ability of PerA, even when an excess of purified protein was used (Figure 4H, 4K and data not shown). PerA_{E234A} showed some interaction with both promoter regions when high concentrations of protein were used (Figure 4I and 4J), which would explain the low activation observed for both promoters (Figure 2). Altogether, these results show the importance, or the lack of it, of defined NTD and CTD PerA residues in both the NTD and CTD for DNA binding, helping us to understand the observed defects in transcriptional activation.

Discussion

PerA plays a central role in controlling directly or indirectly the expression of several key virulence genes in EPEC [14,16,17,22,23,24,25,37], including the *bfp* and *per* operons located in the pEAF (also called pB171) plasmid. Although the role of different PerA residues in gene activation has previously been reported [24], here we have expanded this analysis by assessing the role of residues not previously studied of both the NTD and CTD, in the transcriptional activation of the *perA* and *bfpA* promoters, as well as in DNA binding abilities and in the response to repression by ammonium salts.

Similar to what has been reported for Rns, VirF_{Sb} and ToxT [38,39,40,41], the deletion of discrete and long NTD regions (data not shown) or alanine substitutions of single amino acids in this domain resulted in PerA mutants with impaired activation and DNA binding functions at both promoters. Similarly, NTD PerA mutants G37W, W68G and L94P were not able to activate a *perA-lacZ* transcriptional fusion [24], but the nature of this defect was not determined. In agreement with their defect *in vivo*, here we show that the purified mutants were not able to bind to the promoter DNA fragments *in vitro*. Together our results and those by others support the notion that the NTD plays a critical role in PerA activity and indirectly in DNA binding.

Interaction between both domains NTD and CTD for ToxT and other AraC-like proteins has been studied [42,43]. For ToxT the NTD and CTD form a “closed conformation” clamped onto palmitoleic acid and makes ToxT unable to dimerize and activate transcription. Contrary, in PerA it is possible that the NTD and the CTD domains interact forming a constitutive “open conformation” allowing PerA to bind to *bfpA* and *perA* promoters. Given that no effector molecule has been found for PerA mutations at the NTD may cause a structural change that generates an inactive “close conformation”, as the one induced by fatty acids in ToxT [42,43] or, alternatively, may induce a conformational change that also affects the conformation of the DNA binding domain. However, these and other possibilities should be further evaluated.

Interestingly, mutations in residues D101, E116 and D168, located in positions near the linker region between the NTD and CTD, rendered PerA mutants with a different activation phenotype depending on the promoter tested, PerA_{D101A} showed opposite phenotypes, while slightly less activate for the *bfpA* promoter, it showed increased activity for *perA* (around 77% versus 150%, respectively, in contrast to wild type PerA). PerA_{E116A} was able to interact with both promoter regions *in vitro* in a similar manner as the wt protein, but the mutation had a drastic negative effect in the activation of the *perA* promoter, without affecting *bfpA* activation. Moreover, PerA_{D168A} still bound to both promoters but showed about a 5- to 6- fold reduction in affinity, as estimated by EMSA (Figure 4F and 4G), which intriguingly had a more marked effect on the activation of the *perA* promoter (72% down regulation for *perA*, versus 24% for *bfpA* in comparison to wt PerA). Therefore, and given the results obtained in our study, our current model speculates that these residues differentially participate in protein-protein interactions with one or more RNAP subunits or, alternatively, that these mutations cause conformational changes in PerA that differentially influence promoter recognition and thus activation. Both hypotheses remain to be further tested.

As expected from what has been seen in other studies in AraC-like proteins, most of the mutations in the CTD domain (or DBD) abolished PerA transcriptional activation. Here we extended the observations made by Porter and collaborators [24] on the importance of the CTD by performing DNA binding assays with purified proteins.

A three-dimensional model helped us to predict the orientation of mutated residues in the CTD (Figure 5). Despite the fact that PerA is phylogenetically more related to other virulence regulators in the AraC/XylS family [21], the CTD model is based on the Rob protein DBD because it was the best hit as a template after threading it to other crystal structures using the CPHmodels program. Given their significant sequence similarity, the conserved DBD of other AraC/XylS family proteins are likely to adopt a similar tertiary structure [20,26]. The mutation in D177, which has a similar charge to that in MarA (D22) and SoxS (E16), was severely affected in both activation and DNA binding. An alanine substitution of the corresponding ToxT D181 residue affected the expression of the *V. cholerae* accessory colonization factor (*acf*) gene, but not that of the cholera toxin (*ctx*) gene [39]. The prediction that PerA D177 is not facing the DNA, suggests that it might be making contacts with other amino acids, perhaps with residues at the PerA NTD. Furthermore, PerA residues R199 and K249 are located in α -helices that are most likely facing the DNA, while S194 is in a connecting loop in the same orientation, supporting the idea that these residues are involved in direct interactions with either nucleotide bases or with the phosphodiester backbone. Residues Y255 and P259 are facing to the internal section of this

domain suggesting they may have a role in the structural conformation adopted by the DBD. In support of this notion, Y255 is mainly conserved in AraC-like virulence regulators that are more related to PerA [21]. At this position, most of the family members contain a hydrophobic amino acid, which, according to the MarA crystal structure [44], is within the hydrophobic surface of the HTH2 motif facing hydrophobic surfaces on the other HTH subdomain, making it important for structure integrity.

PerA residue P259 is one of most conserved amino acids in the AraC/XylS family and is part of the family consensus sequence [20]. According to the MarA, ToxT and Rob structures, the equivalent proline is not exposed, as predicted for PerA in our model (Figure 5). The PerA_{P259A} mutant was severely defective for both transcription activation and DNA binding, suggesting that this residue plays an important role in structuring the DBD.

According to the structure of the MarA-mar co-crystal [44,45], the first α -helix (α 1) has no interaction with the DNA, though for SoxS some of the residues have been predicted to make van der Waals contacts with nucleotide bases [46]. PerA residues D168 and D177 are located in α 1 (Figure 5). For D168 we observed a slight defect in *bfpA* activation but a stronger defect in *perA*. DNA shift experiments showed a slight defect in the ability of this protein to interact with both DNA fragments. It is possible that this deficiency accounts for the expression observed in *bfpA* but does not explain the even more drastic defect in *perA* (Figure 2). We hypothesize that this residue is involved in correct folding of the DBD that yields a defected CTD. Alternatively it is possible that D168 is involved also in differential interactions with the RNAP.

We have shown that gene regulation in EPEC is particularly sensitive to the presence of ammonium ions, which represses the expression of both operons [15,22]. Interestingly, PerA mutant Q40R, which is active as the wt protein in DMEM, further repressed the expression of both fusions in the presence of ammonium. Although the molecular mechanism underlying ammonium repression remains unknown, this result suggested that this residue might be part of a functional motif involved in the interaction with a putative EPEC specific negative regulatory molecule that is produced or activated in the presence of ammonium ions. We cannot conclusively rule out the possibility that the ammonium ions are directly exerting this negative effect, but the fact that both promoter fusions are expressed in a non-EPEC background (*e.g.* *E. coli* K12), when complemented with wt PerA in the presence of ammonium, argues against this possibility [22]. Furthermore, we also observed that mutants PerA_{E116A} and PerA_{D168A} were less sensitive to ammonium repression, but only when activating the *perA* promoter, suggesting that albeit having a dramatic effect on *perA* expression, these mutations also generated a conformational change that partially suppressed this defect.

In summary, this study expands the knowledge regarding the critical role that both the NTD and CTD play in DNA binding and PerA-mediated transcriptional activation of the *per* and *bfpA* promoters. It also provides evidence that PerA differentially interacts with both promoters and may possess a putative functional motif that makes it susceptible to ammonium inhibition.

Supporting Information

Figure S1 Expression of PerA variants. Different PerA mutants were expressed in EPEC strain B171-10 and detected by Western blot using anti-PerA antibodies. Whole cell extracts were resolved in a 10% SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, blocked with 5% non-fat milk and blotted with 1:2000 anti-PerA antibodies. B171-10 carrying the empty vector was used as a negative control (Neg. First lane) and purified MBP-PerA was

used as a positive control (last lane). A smaller unspecific band (indicated with an asterisk) worked as a loading control. Indicated are the respective mutated residues for each PerA variant. The arrow shows the band corresponding to PerA. (PPTX)

Acknowledgments

We would like to thank Claudia Martinez and Leticia Villavicencio for generating some of the mutants used in this study, Jorge Yañez for DNA sequencing, Margarita Arenas for supplying reagents; Leigh A. Knodler,

Olivia Steele-Mortimer and Martha Thayer for critically reviewing the manuscript. We also appreciate the suggestions made by the anonymous reviewers.

Author Contributions

Prepared 3D model: EPR. Conceived and designed the experiments: JAI YML JLP. Performed the experiments: JAI CMGZ CLO ACL JST. Analyzed the data: JAI CMGZ YML JLP. Wrote the paper: JAI CMGZ JLP.

References

- Chen HD, Frankel G (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 29: 83–98.
- Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiol Rev* 11: 142–201.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2: 123–140.
- Humphries RM, Armstrong GD (2010) Sticky situation: localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to the small intestine epithelium. *Future Microbiol* 5: 1645–1661.
- Elliott SJ, Sperandio V, Giron JA, Shin S, Mellies JL, et al. (2000) The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 68: 6115–6126.
- Campellone KG, Leong JM (2003) Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157: H7. *Curr Opin Microbiol* 6: 82–90.
- Giron JA, Ho AS, Schoolnik GK (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254: 710–713.
- Bieber D, Ramer SW, Wu CY, Murray WJ, Tobe T, et al. (1998) Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 280: 2114–2118.
- Cleary J, Lai LC, Shaw RK, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg MS, et al. (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 150: 527–538.
- Sohel I, Puente JL, Ramer SW, Bieber D, Wu CY, et al. (1996) Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J Bacteriol* 178: 2613–2628.
- Stone KD, Zhang HZ, Carlson LK, Donnenberg MS (1996) A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol Microbiol* 20: 325–337.
- Sohel I, Puente JL, Murray WJ, Vuopio-Varkila J, Schoolnik GK (1993) Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes. *Mol Microbiol* 7: 563–575.
- Donnenberg MS, Giron JA, Nataro JP, Kaper JB (1992) A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol Microbiol* 6: 3427–3437.
- Bustamante VH, Calva E, Puente JL (1998) Analysis of cis-acting elements required for *bfpA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180: 3013–3016.
- Puente JL, Bieber D, Ramer SW, Murray W, Schoolnik GK (1996) The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* 20: 87–100.
- Gomez-Duarte OG, Kaper JB (1995) A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 63: 1767–1776.
- Tobe T, Schoolnik GK, Sohel I, Bustamante VH, Puente JL (1996) Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 21: 963–975.
- Iida M, Okamura N, Yamazaki M, Yatsuyanagi J, Kurazono T, et al. (2010) Classification of *perA* sequences and their correlation with autoaggregation in typical enteropathogenic *Escherichia coli* isolates collected in Japan and Thailand. *Microbiol Immunol* 54: 184–195.
- Okeke IN, Borneman JA, Shin S, Mellies JL, Quinn LE, et al. (2001) Comparative sequence analysis of the plasmid-encoded regulator of enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* 69: 5553–5564.
- Gallegos MT, Schleif R, Bairoch A, Hofmann K, Ramos JL (1997) AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 393–410.
- Ibarra JA, Perez-Rueda E, Segovia L, Puente JL (2008) The DNA-binding domain as a functional indicator: the case of the AraC/XylS family of transcription factors. *Genetica* 133: 65–76.
- Martinez-Laguna Y, Calva E, Puente JL (1999) Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 33: 153–166.
- Mellies JL, Elliott SJ, Sperandio V, Donnenberg MS, Kaper JB (1999) The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* 33: 296–306.
- Porter ME, Mitchell P, Roe AJ, Free A, Smith DG, et al. (2004) Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 54: 1117–1133.
- Bustamante VH, Villalba MI, Garcia-Angulo VA, Vazquez A, Martinez LC, et al. (2011) PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 82: 398–415.
- Egan SM (2002) Growing repertoire of AraC/XylS activators. *J Bacteriol* 184: 5529–5532.
- Ibarra JA, Villalba MI, Puente JL (2003) Identification of the DNA binding sites of PerA, the transcriptional activator of the *bfp* and *per* operons in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185: 2835–2847.
- Sambrook J, Russell WR (2001) Molecular cloning: a laboratory manual; Sambrook J, editor. Cold Spring Harbor, NY: CSHL Press.
- Meza R, Nunez-Valdez ME, Sanchez J, Bravo A (1996) Isolation of Cry1Ab protein mutants of *Bacillus thuringiensis* by a highly efficient PCR site-directed mutagenesis system. *FEMS Microbiol Lett* 145: 333–339.
- Nielsen M, Lundegaard C, Lund O, Petersen TN (2010) CPHmodels.3.0—remote homology modeling using structure-guided sequence profiles. *Nucleic Acids Res* 38: W576–581.
- Lindahl E, Azuara C, Koehl P, Delarue M (2006) NOMAD-Ref: visualization, deformation and refinement of macromolecular structures based on all-atom normal mode analysis. *Nucleic Acids Res* 34: W52–56.
- Furnham N, Dore AS, Chirgadze DY, de Bakker PI, Depristo MA, et al. (2006) Knowledge-based real-space explorations for low-resolution structure determination. *Structure* 14: 1313–1320.
- Buchan DW, Ward SM, Lobley AE, Nugent TC, Bryson K, et al. (2010) Protein annotation and modelling servers at University College London. *Nucleic Acids Res* 38: W563–568.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
- Ruiz R, Ramos JL (2002) Residues 137 and 153 at the N terminus of the XylS protein influence the effector profile of this transcriptional regulator and the sigma factor used by RNA polymerase to stimulate transcription from its cognate promoter. *J Biol Chem* 277: 7282–7286.
- Ruiz R, Ramos JL (2001) Residues 137 and 153 of XylS influence contacts with the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Biochem Biophys Res Comm* 287: 519–521.
- Tobe T, Tatsuno I, Katayama E, Wu CY, Schoolnik GK, et al. (1999) A novel chromosomal locus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), which encodes a *bfpT*-regulated chaperone-like protein, TrcA, involved in microcolony formation by EPEC. *Mol Microbiol* 33: 741–752.
- Basturea GN, Boder MD, Moreno ME, Munson GP (2008) Residues near the amino terminus of Rns are essential for positive autoregulation and DNA binding. *J Bacteriol* 190: 2279–2285.
- Childers BM, Weber GG, Prouty MG, Castaneda MM, Peng F, et al. (2007) Identification of residues critical for the function of the *Vibrio cholerae* virulence regulator ToxT by scanning alanine mutagenesis. *J Mol Biol* 367: 1413–1430.
- Mahon V, Smyth CJ, Smith SG (2010) Mutagenesis of the Rns regulator of enterotoxigenic *Escherichia coli* reveals roles for a linker sequence and two helix-turn-helix motifs. *Microbiology* 156: 2796–2806.
- Porter ME, Dorman CJ (2002) In vivo DNA-binding and oligomerization properties of the *Shigella flexneri* AraC-like transcriptional regulator VirF as identified by random and site-specific mutagenesis. *J Bacteriol* 184: 531–539.
- Lowden MJ, Skorupski K, Pellegrini M, Chiorazzo MG, Taylor RK, et al. (2010) Structure of *Vibrio cholerae* ToxT reveals a mechanism for fatty acid regulation of virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 2860–2865.
- Childers BM, Cao X, Weber GG, Demeler B, Hart PJ, et al. (2011) N-terminal residues of the *Vibrio cholerae* virulence regulatory protein ToxT involved in dimerization and modulation by fatty acids. *J Biol Chem* 286: 28644–28655.
- Rhee S, Martin RG, Rosner JL, Davies DR (1998) A novel DNA-binding motif in MarA: the first structure for an AraC family transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10413–10418.
- Gillette WK, Martin RG, Rosner JL (2000) Probing the *Escherichia coli* transcriptional activator MarA using alanine-scanning mutagenesis: residues important for DNA binding and activation. *J Mol Biol* 299: 1245–1255.

46. Griffith KL, Wolf RE, Jr. (2002) A comprehensive alanine scanning mutagenesis of the *Escherichia coli* transcriptional activator SoxS: identifying amino acids important for DNA binding and transcription activation. *J Mol Biol* 322: 237–257.
47. Kwon HJ, Bennik MH, Demple B, Ellenberger T (2000) Crystal structure of the *Escherichia coli* Rob transcription factor in complex with DNA. *Nature Struct Biol* 7: 424–430.

APÉNDICE III

Tabla 8. Resultados de los ensayos de actividad Cat

	Promedio 3 ensayos <i>perA-cat</i>	Promedio 3 ensayos <i>bfpA-cat</i>
<i>perA wt</i>	1543.855	1856.845
K14A	128.215	420.805
Y26A	1138.5	2221.985
Y29A	0	20.94
Q40R	1200.76	2453.535
D100A	1132.875	1078.25
D101A	1581.57	1675.395
E116A	72.965	1709.685
D128A	1256.34	2323.965
N135G	585	1125
D149A	0	20
D150A	300	850.49
S163R	675	1125
D168A	429.19	1414.085
D177A	0	20
D233A	0	20
E234A	275.405	104.9

Tabla 9. Actividad Cat específica bajo tres condiciones de reacción, promedio de 3 ensayos

	37°C <i>bfpA</i>	37°C + NH4 <i>bfpA</i>	40°C <i>bfpA</i>	37°C <i>perA</i>	37°C + NH4 <i>perA</i>	40°C <i>perA</i>
<i>perA wt</i>	1771.76	974.28	2064.95	1052.92	382.56	687.65
K14A	409.03	65.43	0	132.95	19.69	0
Y26A	2027.41	77.45	159.7	1084	101.66	77
Y29A	19.48	1.56	0	0	0	0
Q40R	2409.62	203.08	1914	1174.73	81.51	686.6
D100A	1532.97	363.03	879.96	1063.8	411.73	409.66
D101A	1360.24	349.37	527.55	1582.49	557.81	1404.37
E116A	1681.69	321.86	497.96	49.69	434.34	221.33
D128A	125.15	81.37				
D150A				600		
S162R	3250	2250	2400	1200	780	1080
S163R	2250	1800	2400	1350	450	800
D168A	1349.19	256.83	294.48	292.6	454.31	242.06
D177A				0		
E234A	99.93	0	0	80	0	0

Tabla 10. Actividad Cat específica de la fusión *bfpA-cat* en presencia de la subunidad de la RNAP

Nombre	Promedio de 3 ensayos
- <i>rpoD</i> wt	1110.99
-EA574	740.11
-IA590	1466.33
-EA591	1290.89
-KA593	1471.77
-LA595	1408.43
-RA596	1765.26
-KA597	1585.92
-LA598	1427.16
-RA599	1401.22
-HA600	1698.66
-SA602	1365.60
-RA603	1014.59
-RA605	1133.76
-RA608	1239.15
-DA612	1421.39
-DA613	1705.48

Tabla 11. Actividad Cat específica de la fusión *perA-cat* en presencia de la subunidad de la RNAP

Nombre	Promedio de 3 ensayos
- <i>rpoD</i> wt	1168.71
-EA574	477.60
-IA590	371.51
-EA591	452.67
-KA593	881.06
-LA595	726.18
-RA596	393.74
-KA597	476.05
-LA598	814.88
-RA599	623.25
-HA600	992.95
-SA602	1057.16
-RA603	677.75
-RA605	649.15
-DA612	1028.41
-DA613	817.23

Tabla 12. Actividad Cat específica de la fusión *perA-cat* en presencia de la subunidad de la RNAP

Nombre	Promedio de 3 ensayos
- <i>rpoA</i> wt	748.86
-R255A	185.18
-P256A	922.84
-V257A	439.44
-D258A	221.39
-D259A	335.91
-L260A	243.52
-E261A	391.54
-L262A	521.87
-T263A	546.89
-V264A	589.76
-R265A	493.15
-N268A	535.91
-C269A	461.38
-L270A	478.86
-K271A	542.06
-E273A	409.88
-I275A	186.85
-H276A	650.9
-I278A	637.61
-G279A	540.9
-L281A	437.64
-V282A	406.88
-R284A	437.96
-E288A	573.08
-L289A	525.96
-P323A	480.53
-I326A	533.63
-E329A	552.12

Tabla 13. Actividad Cat específica de la fusión *bfpA-cat* en presencia de la subunidad de la RNAP

Nombre	Promedio de 3 ensayos
- <i>rpoA</i> wt	1127.32
-D258A	1024.17
-E261A	65.8
-L262A	339.03
-T263A	336.8
-R265A	279.9
-C269A	285.2
-K271A	409.3
-E273A	245.77
-I275A	625.95
-H276A	225.62
-Y277A	485
-L289A	895.17
-P293A	266.4

