

00591  
12 A

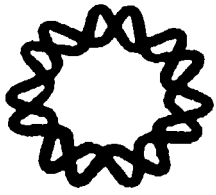


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR

CARACTERIZACION DE LOS SITIOS DE UNION DEL  
ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL *PerA* EN LOS GENES *bfpA* Y  
*perA* DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGENA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS  
P R E S E N T A :  
JOSE ANTONIO IBARRA GARCIA





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# **PAGINACIÓN DISCONTINUA**

B

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. José Luis Puente García en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Cuernavaca, Morelos, México.

El comité tutorial estuvo conformado por:

Dr. José Luis Puente García

Dra. Gloria Soberón Chávez

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

Dr. Edmundo Calva Mercado

Durante el desarrollo del trabajo, el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (num. 86036), así como de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) y del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado de la UNAM (num. 103329). Además del apoyo del proyecto CONACYT num. 33115-N y de la beca Howard Hughes Medical Research Scholar otorgada a J.L.P.G..

## AGRADECIMIENTOS

A Norma por su amor, cariño, apoyo, paciencia, consejos, sueños, ideas y demás detalles que hacen de nuestra relación algo único. A mi pequeño Toñito por su amor, cariño, enseñanzas, apoyo y paciencia para cuando su papá se desaparecía para ir al "lab". Ustedes saben que este proyecto ha crecido junto con nosotros y por fin llego a término.

A José Luis Puente por su amistad y por haber confiado en mí desde el primer momento en que me aperecí por su oficina, además de todo el apoyo y consejos que siempre me ha brindado. Al Dr. Calva por compartir su filosofía y alegría de la vida con todos los integrantes del lab. A todos los integrantes del laboratorio: Mario Alberto, Víctor A., Diana, Cristina, Karol, Adriana, Ulises, Jeanette, Alma, Carmen, Verónica, Mario Gerardo, Rosalviux, Ygnacio, Claudia S., Irma, Paty J., Elvira, y, además, en especial a Víctor Bustamante por las discusiones y bromas alrededor de éste y otros proyectos, Miryam Villalba por su valentía al dejarse dirigir en su tesis de licenciatura, Martha Sosa por haberme heredado el plásmido que dio origen y continuidad a esto, Olivia por haberse dejado robar células HeLa y Hep-2 para varios de los experimentos, Alejandra por las mutantes usadas en este y otros proyectos, Marcos y Ricardo que compartieron varias de sus técnicas conmigo. También, y aunque repita, a José Luis, Marcos, Amapola; Gabriel Guillén y Francisco por haber ido más allá en su ayuda para conmigo. Al buen Efrén Galván por sus consejos y guía.

Al Dr. Alejandro Alagón por su colaboración, consejos y gran disponibilidad para obtener el anticuerpo anti-PerA y otros sueros, además a los integrantes de su grupo Marco A., Ricardo, Roberto, Judith y Rosana. A los Drs. Gustavo Pedraza, Yvonne Rosenstein y Angelica Santana por su "tips" para estandarizar la técnica de EMSA. A Sonia Cuellar por sus consejos en la técnica de entrecruzamiento químico.

A George Munson, Robert Edwards y Linda Kenney por oirme y aconsejarme experimentos.

A los Drs. Gloria Soberón Edmundo Calva y Miguel Angel Cevallos por su guía, sugerencias y críticas al formar parte de mi comité tutorial.

A mis sinodales por la crítica revisión de esta tesis.

*A Norma y Toñito  
con amor*

“Los amorosos juegan a coger el agua,  
a tatuar el humo, a no irse.  
Juegan un rato, el triste juego del amor.  
Nadie ha de resignarse.  
Dicen que nadie ha de resignarse.  
Los amorosos se avergüenzan de toda  
conformación.”

*A la memoria de mi madre, Silvia García Palma*

“Morir es retirarse, hacerse a un lado,  
ocultarse un momento, estarse quieto,  
pasar el aire de una orilla a nado  
y estar en todas partes en secreto.”

E

“Deseamos encontrar la verdad, no importa cual sea. Pero para encontrar la verdad necesitamos tanta imaginación como escepticismo. No seremos temerosos de especular, pero seremos cuidadosos en distinguir la especulación de los hechos”.

*Carl Sagan.*

“Aun la investigación mas estricta, efectiva y exitosa, sólo puede alcanzar a ser una afirmación refutable, nunca una verdad absoluta como la que se pretende lograr con dicha investigación”.

*Karl Popper.*

“Topa con nuestra tendencia humana a creer que toda cosa real en el universo actual era necesaria y desde siempre. Hay que estar siempre en guardia contra ese sentimiento tan poderoso del destino. El destino se escribe a medida que se cumple, no antes”.

*Jacques Monod.*

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página.</b>
<b>ÍNDICE</b>	i
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	ii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	iv
<b>LISTA DE TABLAS</b>	v
<b>RESUMEN</b>	vi
<b>ABSTRACT</b>	vii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>I.1 <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)</b>	2
<b>I.1.2 Mecanismo de Patogenicidad.</b>	3
<b>I.1.3 El pilus BFP.</b>	13
<b>I.1.4 Regulación de los genes de virulencia en EPEC.</b>	17
<b>I.1.5 El regulador PerA (BfpT).</b>	20
<b>II. Antecedentes.</b>	24
<b>III. Hipótesis.</b>	25
<b>IV. Objetivos.</b>	25
<b>V. Materiales y métodos.</b>	26
<b>VI. Resultados.</b>	46
<b>VII. Discusión.</b>	72
<b>VIII. Conclusiones.</b>	80
<b>IX. Bibliografía.</b>	81
<b>X. Anexos.</b>	
<b>Apéndice 1.</b>	91
<b>Apéndice II.</b>	105



## LISTA DE ABREVIATURAS.

A.	Adenina.
A/E.	Adherencia y eliminación de microvellosidades.
Amp.	Ampicilina.
AMPc	Adenosin monofosfato
Arp2/3	Complejo de 7 proteínas, dos de las cuales son similares a actina (2 y 3).
ATP.	Adenosin-trifosfato
BFP.	Pilus formador de haces (por sus siglas en inglés).
BSA.	Albúmina sérica bovina (por sus siglas en inglés).
C.	Citosina.
°C	Grados centígrados
CAT.	Enzima cloranfenicol acetil transferasa.
Cm.	Cloranfenicol.
cpm.	Cuentas por minuto.
DME.	Medio de cultivo para células eucariotes tipo Eagle modificado por Dulbecco
DNA.	Ácido desoxiribonucleico (por sus siglas en inglés).
DNasa I	Enzima DNasa I.
DO.	Densidad óptica.
DTNB.	Ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico).
DTT.	Ditiotreitól.
EAF.	Factor de adhesión de EPEC (por sus siglas en inglés).
EDTA.	Ácido etilén-diamino-tetra-ácetico
EHEC.	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica.
ELISA.	Ensayo de enzima unida a inmunoabsorbente (por sus siglas en inglés).
EMSA	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (por sus siglas en inglés).
EPEC.	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena.
Esp.	Proteína secretada de EPEC.
et al.	Otros colaboradores.
G.	Guanina.
Gm.	Gentamicina.
HEPES.	N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfónico)
H-NS.	Proteína parecida a histona.
HRP.	Enzima peroxidasa de rábano (por sus siglas en inglés).
HTH.	Motivo de unión a DNA tipo $\alpha$ -hélice-vuelta- $\alpha$ -hélice.
IHF.	Factor de integración al cromosoma (por sus siglas en inglés).
IL-8.	Interleucina 8.
IPTG	Inductor isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
K <sub>d</sub> .	Constante de disociación.
kDa.	Kilodaltones.
Km.	Kanamicina.
Kpb.	Kilopares de bases de DNA.
LB.	Medio de cultivo tipo Luria (por sus siglas en inglés).
LEE.	Locus de eliminación de enterocitos (por sus siglas en inglés).

MBP.	Proteína de unión a maltosa (por sus siglas en inglés).
MAPK.	Proteína cinasa activada por mitógeno (por sus siglas en inglés).
mg.	Miligramos
µg.	Microgramos.
mL.	Mililitros.
µL.	Microlitros.
µM.	Micromolar.
µm	Micrómetro o micra ( $10^{-6}$ m).
Nal.	Ácido nalidíxico.
Nd.	No determinado.
NE	No específico.
ng	Nanogramos
NM.	No móvil.
nM.	Nanomolar.
op.	Operador.
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
pb.	Pares de bases.
PBS.	Regulador o amortiguador salino de fosfatos (por sus siglas en inglés).
PBSA.	Sitio de unión de PerA en <i>bfpA</i> (por sus siglas en inglés).
PBST.	Sitio de unión de PerA en <i>perA</i> (por sus siglas en inglés).
PCR.	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés).
PerA.	Regulador codificado en plásmido (por sus siglas en inglés).
PKA.	Proteín cinasa A.
PKC.	Proteín cinasa C.
PLCγ	Fosfolipasa C gamma.
PM.	Peso molecular.
RNA.	Ácido ribonucleico.
RNAP.	RNA polimerasa.
rpm.	Revoluciones por minuto.
Sm.	Estreptomina
SDS.	Lauril sulfato de sodio (por sus siglas en inglés).
SPDP.	N-succinidimil 3-[2-piridil-ditio] propionato
TBE.	Tris boratos EDTA.
TBS.	Solución salina de tris boratos.
T.	Timina.
Tc.	Tetraciclina.
TGE.	Regulador tris glicina EDTA.
Tir.	Receptor translocado de la intimina.
Tris.	Tris (hidroximetil) animometano.
V.	Volts.
W.	Watts.

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.

	Página
<b>Figura 1.</b> Mecanismo de patogenicidad de EPEC en tres etapas .	6
<b>Figura 2.</b> Esquema de regulación de la isla de patogenicidad LEE.	9
<b>Figura 3.</b> Transducción de señales ocasionada por EPEC en la célula huésped.	12
<b>Figura 4.</b> Organización de los operones <i>bfp</i> y <i>per</i> .	16
<b>Figura 5.</b> Esquema de regulación de los genes <i>bfp</i> y <i>per</i> .	19
<b>Figura 6.</b> Alineamiento del extremo carboxilo terminal de PerA con las proteínas SoxS, MarA, y Rob.	23
<b>Figura 7.</b> Alineamiento de las regiones promotoras de <i>bfpA</i> y <i>perA</i> .	24
<b>Figura 8.</b> Purificación de MBP-PerA.	47
<b>Figura 9.</b> Purificación de MBP-PerA (2).	48
<b>Figura 10.</b> Complementación de una mutante <i>perA::km</i> con MBP-PerA	49
<b>Figura 11.</b> EMSA de las regiones reguladoras de <i>bfpA</i> y <i>perA</i> .	52
<b>Figura 12.</b> Retardo de fragmentos de PCR de <i>bfpA</i>	53
<b>Figura 13.</b> Retardo de fragmentos de PCR de <i>perA</i> .	54
<b>Figura 14.</b> Ensayo de protección a DNasa I de las regiones promotoras de <i>bfpA</i> y <i>perA</i> .	55
<b>Figura 15.</b> EMSA de oligonucleótidos de 45 pb de <i>bfpA</i> y <i>perA</i> .	57
<b>Figura 16.</b> EMSA de oligonucleótidos con recortes.	62
<b>Figura 17.</b> Protección a la acción de la DNasa I del segundo sitio de pegado de PerA en <i>bfpA</i> .	65
<b>Figura 18.</b> Actividad de las fusiones transcripcionales de <i>bfpA-cat</i> con recortes en 3'.	66
<b>Figura 19.</b> Mecanismo de detección de interacciones proteína-proteína basados en el sistema de LexA.	68
<b>Figura 20.</b> Complementación de una mutante <i>perA::km</i> con las fusiones LexA-PerA	69
<b>Figura 21.</b> Actividad de $\beta$ -galactosidasa de la fusión <i>silA-lacZ</i> .	70

<b>Figura 22.</b> Actividad de la fusión <i>bfpA-cat</i> en la cepa E2348/69 complementada con la probable dominante negativa	71
<b>Figura 23.</b> Interacción de Rob y MarA con el DNA.	79
<b>Figura 24.</b> Posible modelo de activación de los genes <i>bfpA</i> y <i>perA</i> por el activador transcripcional PerA.	80

## TABLAS

	<b>Páginas.</b>
<b>Tabla 1.</b> Proteínas homólogas a las codificadas en el locus <i>bfp</i> .	16
<b>Tabla 2.</b> Cepas bacterianas y plásmidos usados en este trabajo.	39
<b>Tabla 3.</b> Oligonucleótidos usados en este estudio.	41
<b>Tabla 4.</b> Retardo relativo de oligonucleótidos de la región de la región reguladora de <i>bfpA</i> .	63
<b>Tabla 5.</b> Retardo relativo de oligonucleótidos de la región reguladora de <i>perA</i> .	64

## RESUMEN

### CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE UNIÓN DEL ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL PerA EN LOS GENES *hfpA* Y *perA* DE *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA.

El pilus formador de haces (BFP) es un factor de virulencia importante en la patogénesis de *Escherichia coli* enteropatógena. Los genes involucrados en su biogénesis y regulación son regulados rigurosamente por PerA, un miembro de la familia AraC/XylS de reguladores transcripcionales. El objetivo de este trabajo fue estudiar las interacciones de PerA con las regiones reguladoras de los genes *hfpA* y *perA*, con el fin de definir las bases moleculares de la activación dependiente de este regulador. PerA se purificó como una proteína de fusión a MBP. La funcionalidad de la fusión MBP-PerA se comprobó por su capacidad de complementar la expresión de *hfpA* y el fenotipo de adherencia localizada en una mutante *perA::Km* de EPEC. Se realizaron experimentos de protección a la enzima DNasa I y de cambio en la movilidad electroforética de oligonucleótidos de doble cadena (EMSA, por sus siglas en inglés), los cuales demostraron que PerA reconoce secuencias nucleotídicas asimétricas ricas en AT de 40 pb localizadas río arriba de los genes *hfpA* y *perA*. Experimentos tipo EMSA con oligonucleótidos con diferentes recortes indicaron que la región mínima de unión para PerA era de 40 pb en ambos genes. La región de unión de PerA en *hfpA* comprende la región entre las posiciones -85 a -46, lo cual concuerda con observaciones previas que mostraban que esta región se requiere para la activación PerA dependiente de éste gen. En *perA*, el sitio de unión se localiza entre las posiciones -81 a -42, la cual también se había determinado como necesaria para la activación transcripcional. La posición de interacción de PerA con respecto a la región promotora -35, difiere entre ambos genes por aproximadamente una vuelta de la hélice de DNA; sin embargo, el significado de ésta característica no es claro aún. Interesantemente, se identificó un segundo sitio de unión para PerA en la región estructural de *hfpA*. Este sitio no es necesario para la expresión de una fusión *hfpA-cat*, pero su eliminación incremento su expresión en dos veces, sugiriendo que tiene un papel modulador. El tamaño de la secuencia de pegado de PerA sugirió que dos monómeros de proteína, probablemente actuando como dímeros, interactúan con la región blanco. Usando un sistema basado en LexA y la sobre-expresión del dominio amino terminal de PerA, se obtuvieron evidencias preliminares de que PerA actúa como monómero. Esto en contraste con lo observado para otras proteínas de la familia AraC. Estos resultados no excluyen la posibilidad de que PerA dimerice cuando interacciona con sus sitios de unión en el DNA, lo cual es materia de investigación en el laboratorio.

**ABSTRACT****CHARACTERIZATION OF THE DNA BINDING SITES OF PerA, THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR OF THE *bfpA* AND *perA* GENES OF ENTEROPATHOGENIC *Escherichia coli*.**

The bundle-forming pilus (BFP) is an important virulence factor for enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) pathogenesis. Genes involved in its biogenesis and regulation are tightly regulated by PerA, a member of the AraC/XylS family of transcriptional regulators. The aim of this work was to study PerA interactions with the regulatory regions of *bfpA* and *perA* to define the molecular basis of PerA-dependent activation. PerA was purified as a MBP fusion protein. The functionality of MBP-PerA was ensured by assessing its capacity to complement *bfpA* expression and the localized adherence phenotype in an EPEC *perA::Km* mutant. DNase I footprinting and gel mobility shift assays (EMSA) using double-stranded oligonucleotides showed that MBP-PerA recognizes asymmetric nucleotide sequences in a 40-bp-long AT-rich tract located upstream of both *bfpA* and *perA*. EMSAs using oligonucleotides of different sizes indicated that PerA binding has a minimum length requirement of 40-bp. In *bfpA* the PerA binding site spans between positions -84 to -46, which is in accordance with previous observations showing that this region is required for the PerA-dependent activation of this gene. In *perA*, the PerA binding site is located between positions -81 to -42, a region also previously shown by gene fusion analysis to be required for transcriptional activation. The position of the PerA binding site, with respect to the -35 promoter sequence, differs between both genes for about one helix turn; however, the significance of this feature is still unclear. A second PerA binding site was identified at the 5' end of the *bfpA* coding sequence. This site was not necessary for *bfpA* expression, but its deletion increased its expression by two-fold, suggesting that it plays a modulatory role. The sequence length requirement for PerA binding suggested that two protein monomers, probably acting as a dimer, interact with the target sequence. Using a LexA based system and over expression of the amino terminal domain of PerA, we obtained preliminary evidence indicating that PerA does not dimerize, in contrast to what has been observed for other AraC-like proteins. This result does not exclude the possibility that PerA dimerizes upon interaction with its DNA binding sites, which is a matter of current investigation.

## I. INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo que mide de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de longitud y 1  $\mu\text{m}$  de ancho que se caracteriza por fermentar la lactosa y la glucosa, producir ácido y desprender gases (en la mayoría de las cepas), generalmente es móvil y no utiliza el citrato (Farmer y Kelly, 1991).

*E. coli* es el microorganismo que ha sido más ampliamente estudiado, genética, bioquímica y metabólicamente. A pesar de que su genoma ha sido secuenciado en su totalidad (Blattner et al. 1997), aún no se conocen con detalle todos sus procesos vitales ni la función de la totalidad de sus genes.

Las cepas de *E. coli* se encuentran en las vías digestivas de varios animales, incluidos los mamíferos, y es considerada una especie inocua para sus organismos huésped. Dentro de la especie también se encuentran variedades patógenas para el humano. Éstas se pueden clasificar en dos grandes grupos: intestinales y extra-intestinales, dentro de estas últimas se encuentran las uropatógenas (que afectan las vías urinarias) y las productoras de sepsis neonatal. Dentro de las intestinales se reconocen varios grupos, o patotipos, que se caracterizan por sus propiedades patógenas (Puente y Finlay, 2001) a saber:

**Enteropatógenas, EPEC**, tienen la propiedad de adherirse en forma de microcolonias a las células intestinales y producen la lesión de adherencia y eliminación de microvellosidades (A/E, "Attaching and effacing" ver más adelante). No producen enterotoxinas o citotoxinas.

**Enterohemorrágicas, EHEC**, también causan la lesión A/E, pero se diferencian de EPEC porque producen citotoxinas, conocidas como toxinas Shiga (Stx), y una hemolisina. Se les ha involucrado con la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico.

**Enterotoxigénicas, ETEC**, producen una, o ambas, clases de enterotoxinas (termolábil, LT, y termoestable, ST) que se caracterizan por producir una diarrea parecida a la ocasionada por *Vibrio cholerae*. También producen una gran variedad de factores de colonización o CFA's.

**Enteroinvasivas, EIEC**, se caracterizan por invadir las células del intestino y por diseminarse a células aledañas. Esta manera de invadir es muy similar a la producida por *Shigella* sp.

**Enteroagregativas, EAaggEC**, se adhieren en forma apilada sobre las células epiteliales y sobre la matriz extracelular, tienen la capacidad de producir enterotoxinas (EAST y Pet) y una hemolisina.

**Enteroadherentes difusas, DAEC**, se adhieren sobre toda la superficie celular y no se les conoce alguna enterotoxina. Interesantemente, son capaces de originar cambios en la morfología de la célula huésped, a través de la transducción de señales, a partir de la adhesión por el pilus Afa/Dr (Servin, 2002).

### **I. 1 *E. coli* enteropatógena (EPEC).**

Este fue el primer grupo de *E. coli* descrito hace más de 50 años como agente etiológico de la diarrea infantil; sin embargo, el estudio de sus mecanismos de patogenicidad se inició hasta hace apenas dos décadas (Levine, 1987). Actualmente, EPEC es uno de los microorganismos más ampliamente estudiados dados sus fascinantes mecanismos de virulencia y regulación.

Las cepas del grupo EPEC son la principal causa de diarrea de tipo bacteriana en niños menores de 6 meses en todo el mundo, principalmente en países en vías de desarrollo, o mal llamados del tercer mundo (Nataro y Kaper, 1998; citado en Puente y Finlay, 2001).



La diarrea causada por EPEC se caracteriza por ser prolongada y de tipo acuoso de severidad variable, acompañada de vómito y febrícula. Las cepas de EPEC no producen enterotoxinas o citotoxinas, y tampoco se caracterizan por ser invasivas. A continuación se describe el mecanismo conocido hasta el momento.

### **1.1.2 Mecanismo de Patogenicidad.**

Para efectos prácticos, el mecanismo de patogenicidad de EPEC se ha dividido en tres etapas (Fig. 1):

**1. Adherencia inicial.** EPEC se distingue por la capacidad que tiene de adherirse de forma localizada, formando microcolonias sobre la superficie de la célula huésped (Fig. 1A). La formación de las microcolonias se debe a la presencia de un pilus tipo IV denominado "Bundle-forming pilus" (BFP) que es codificado en un plásmido de alto peso molecular (de 69 a 80 kpb dependiendo de la cepa) conocido como EAF ("EPEC adherence factor") (Baldini et al. 1983; Tobe et al. 1999b). Más adelante se mencionarán las características de este pilus.

El receptor en la célula eucariote para el BFP no ha sido identificado con precisión, pero se ha sugerido que se une a un fosfolípido del tipo fosfatidil-etanolamina (Barnett-Foster et al. 1999; Khursigara et al. 2001). La unión a éste compuesto parecería explicar el entrecruzamiento de las bacterias y la consiguiente formación de la microcolonia. Por otro lado, se ha dudado que el BFP tenga un papel relevante en la adherencia inicial de EPEC, y por tanto en la patogénesis, y se le ha relegado a un papel de formador de la microcolonia (Hicks et al. 1998). Sin embargo, su papel como factor de virulencia fue determinado en un estudio con voluntarios realizado por Bieber et al. (1998), en el que se demostró que una cepa mutada en el gen *bfpA* no causa diarrea. Una vez que la bacteria ha entrado en

contacto con la célula huésped, el BFP desaparece del agregado bacteriano, y EPEC comienza a dispersarse en la superficie celular (Tobe y Sasakawa, 2001).

Recientemente, se ha propuesto que el flagelo participa en la adherencia de EPEC estableciendo contactos con la célula epitelial y estabilizando la microcolonia (Girón et al. 2002).

**2. Transducción de señales y eliminación de microvellosidades.** Una vez que la bacteria se adhiere, se ha propuesto que otro filamento entra en contacto con la superficie celular (Fig. 1B). Este filamento está constituido por la proteína EspA (Knutton et al. 1998), la cual es una de las proteínas que son secretadas por una vía de secreción tipo III. La isla LEE ("Locus of Enterocyte Effacement"), de 35 kpb, está insertada e interrumpiendo, generalmente, el gen *sefC*. Sus 41 genes codifican las proteínas involucradas en el ensamblaje de un aparato de secreción tipo III, además de proteínas efectoras, una adhesina, un receptor y un regulador transcripcional (Figs. 1C y 2) (Elliot et al. 1998).

Los sistemas de secreción tipo III se caracterizan por formar agujas moleculares que inyectan proteínas efectoras directamente a una célula huésped, ya sea vegetal o animal. Tienen su origen evolutivo en el flagelo, ya que sus cuerpos basales y algunas otras proteínas son similares en su estructura y en su secuencia de aminoácidos. Difieren de los otros sistemas de secreción por carecer, aparentemente, de una secuencia señal para su secreción, aunque se ha postulado que ésta podría residir en el RNA mensajero, lo que ha llevado a proponer un modelo de excreción acoplada a la traducción. También se caracteriza porque casi todas las proteínas secretadas tienen sus propias proteínas chaperonas (Plano et al. 2001; Aldridge y Hughes, 2001; Büttner y Bonas, 2002).

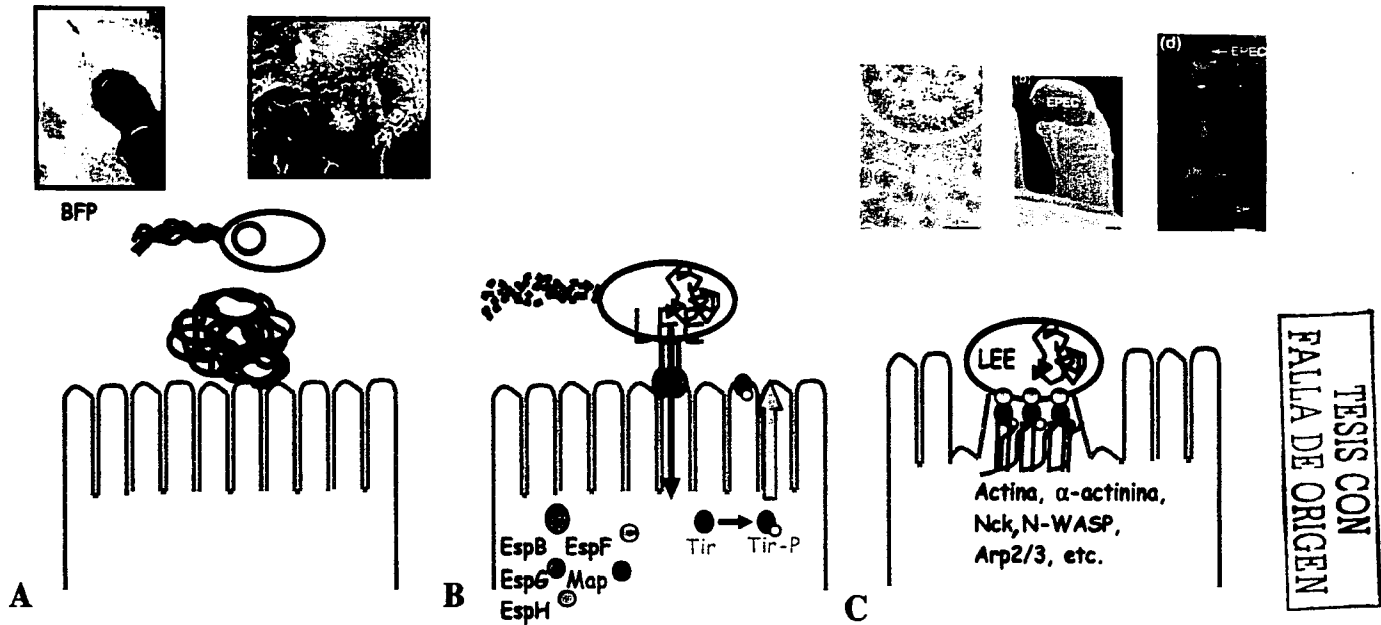
En el caso de EPEC, la secreción de las proteínas efectoras y del receptor depende totalmente de su aparato de secreción (Jarvis et al. 1995; Kenny et al. 1997b).

Ultraestructuralmente, EPEC produce complejos de secreción muy similares a los ya observados en *Salmonella* y *Shigella*, pero difiere de éstos por tener complejos de aguja más largos y gruesos (Fig. 1B) (Sekiya et al. 2001). EscF atraviesa las dos membranas a través de los dos anillos basales y EspA se polimeriza en el extremo de EscF a manera de la funda de un cuchillo, extendiéndose hasta más de 600 nm de largo.

Una vez que EPEC se ha puesto en contacto con la célula huésped, varias proteínas codificadas en el extremo 3' de la isla LEE son introducidas a la célula a través de un poro que forman en conjunto EspB y EspD (Fig. 1B) (Warawa et al. 1999; Ide et al. 2001). Cabe mencionar que estas proteínas son secretadas al medio de cultivo en una mutante *espA*, pero no son translocadas si ésta proteína no está presente en la aguja molecular (Knutton et al. 1998; Shaw et al. 2001). Dentro de las proteínas que se introducen a la célula huésped se encuentran:

**EspB**, tiene un peso de 38 kDa y resulta muy interesante al tener al menos dos funciones, como formador del poro para la inyección de proteínas (junto con **EspD**) y como proteína efectora dentro de la célula huésped, con un papel aún desconocido. Aparentemente, actúa como una toxina para el citoesqueleto ya que altera la distribución de los filamentos de actina (Taylor et al. 1999).

**EspD**, forma parte, junto con EspB, del poro por el que son translocadas las señales hacia la célula. Hasta el momento no se ha encontrado que tenga una función como proteína efectora.



**Figura 1.** Mecanismo de patogenicidad de EPEC en tres etapas. En la primera etapa (A), el pilus BFP es responsable de la adherencia localizada. En los recuadros se muestran micrografías del pilus y de la microcolonia sobre una célula epitelial. En la segunda etapa (B) ocurre la translocación de las proteínas efectoras Esp, Map y Tir a través de un aparato de secreción tipo III. En esta etapa Tir es fosforilada en el residuo Y474 y es translocada en la membrana de la célula epitelial. En la última etapa (C), Tir interacciona con la proteína Intimina, que se localiza en la membrana externa de la bacteria. Esto lleva a la adhesión íntima y al reclutamiento de la proteína adaptadora Nck, que a su vez recluta a N-WASP, que a su vez recluta al complejo Arp2/3. Estas proteínas están involucradas en la movilidad del citoesqueleto celular, y llevan a cabo la nucleación de actina debajo del sitio de adhesión bacteriana y a la formación de una estructura que semeja a un pedestal (ver recuadros). Para mayor detalle referirse al texto.

**EspF**, es una proteína rica en residuos de prolina, una característica de proteínas de origen eucariote que provee la capacidad de unir dominios SH3 de otras proteínas. EspF está involucrada en la pérdida de la resistencia eléctrica transepitelial, además de aumentar la permeabilidad de la monocapa y la redistribución de la proteína ocludina, la cual está involucrada en la formación de las uniones estrechas (McNamara et al. 2001). Cuando ésta es sobreproducida en la célula huésped llega a ocasionar la muerte por apoptosis (Crane et al. 2001). Su papel en la formación de la lesión A/E no es evidente, pero podría estar involucrada en la producción de diarrea.

**EspG**, es una proteína de 44 kDa que tiene 21% de identidad con VirA de *Shigella* sp.. Una mutante de EPEC en éste gen no tiene fenotipo *in vitro*; sin embargo, una mutante en la cepa REPEC ("rabbit enteropathogenic *E. coli*") mostró una disminución en su capacidad de colonizar el intestino del conejo (Elliott et al. 2001).

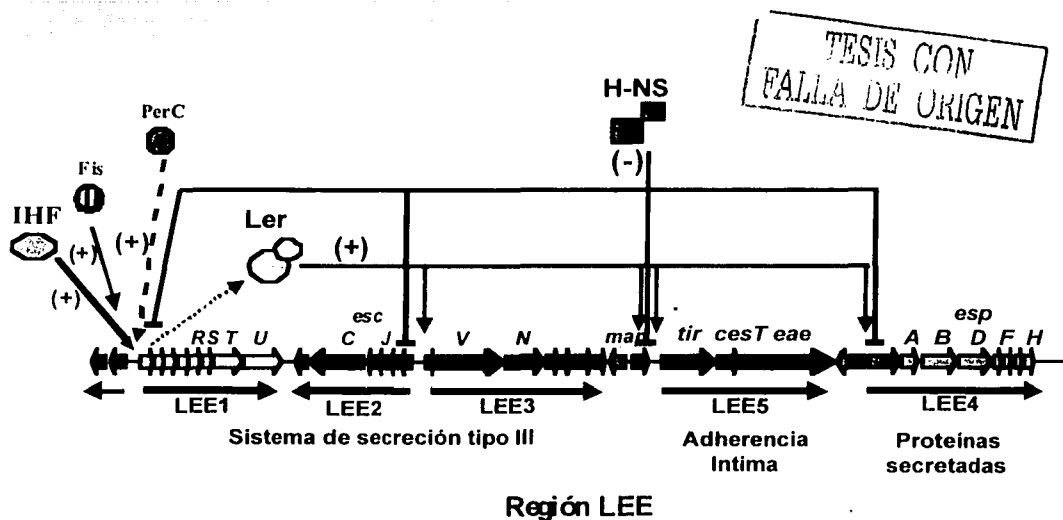
**EspH**. Se transloca y se coloca debajo de la microcolonia y a parecer tiene un efecto contrario al de Map al disminuir la formación de filopodios, además de atenuar la formación de pedestales (Tu et al. 2003).

**Map**, una vez translocada se dirige a la mitocondria de la célula huésped donde, aparentemente, interfiere con el potencial de membrana de éste organelo; se propone que puede ser una proteína anti-apoptótica (Kenny y Jepson, 2000). También se ha propuesto que Map tiene un papel en la formación de rearrreglos del citoesqueleto en el sitio de adhesión y que son diferentes a los producidos por Tir (Kenny et al. 2002). Este efecto es dependiente de la GTPasa Cdc42, lo cual sugiere que Map podría tener un papel del tipo GEF (factor intercambiador de nucleótido), similar a lo que ocurre en *Salmonella* con SopE (Kenny, 2002).

**Tir** (“translocated intimin receptor”). Inicialmente fue descrita como una proteína de origen eucariote y se le nombró Hp90 porque se observó que una proteína de 90 kDa era fosforilada en la célula huésped después de la infección con EPEC (Rosenshine et al. 1996). Posteriormente, se descubrió que su origen era procariótico y que era inyectada por EPEC a través de la vía de secreción tipo III codificada en el LEE (Kenny et al. 1997a). Tir se secreta como una proteína de 78 kDa, pero una vez dentro de la célula eucariótica es fosforilada en un residuo de tirosina en la posición 474 y muestra un cambio de movilidad electroforética a 90 kDa (Kenny, 1999). La fosforilación de esta tirosina es un paso importante para la formación del pedestal *in vitro* con EPEC y *Citrobacter rodentium*, no así para la Tir de EHEC, donde este procesamiento no es necesario para la formación del pedestal (Kenny, 2001; DeVinney et al. 2001), lo que sugiere que la acumulación de actina en EHEC se lleva a cabo por un mecanismo diferente. Recientemente, usando un modelo animal de infección con *C. rodentium* se encontró que la fosforilación de Tir no es importante para la colonización y la inducción de hiperplasia (Deng et al. 2003).

**3. Adherencia íntima.** En esta etapa Tir se inserta en la membrana de la célula huésped y actúa como el receptor de la proteína intimina, la cual está en la membrana externa de EPEC (Fig. 1C). Se ha propuesto que la tirosin-quinasa que fosforila a Tir es PKA (proteín-quinasa-A dependiente de AMPc) (Warawa y Kenny, 2001). Una vez fosforilada, Tir es capaz de reclutar a las proteínas adaptadoras Nck1 y Nck2 (Gruendheid et al. 2001). Sucesivamente, Nck fosforilada es capaz de reclutar a la proteína N-WASP, la cual es un regulador de cambios en el citoesqueleto, y ésta, a su vez, recluta al complejo Arp2/3, que es capaz de nuclear actina. Esta parece ser la vía que ocasiona la movilización de actina para la formación del pedestal, lo que semeja los cometas formados por *Listeria monocytogenes* y *Shigella* sp. (Kalnan et al. 1999; Lommel et al. 2001; Frischknecht y

Way, 2002). En contraste con los mecanismos de movilización inducidos por ActA e IcsA, de *L. monocytogenes* y *S. flexneri*, Tir por sí sola no es capaz de originar los cambios necesarios para la formación del pedestal (Kenny y Warawa, 2001).



**Figura 2.** Esquema de regulación de la isla de patogenicidad LEE. Los genes que constituyen los operones LEE1, LEE2 y LEE3 codifican para las proteínas del aparato de secreción tipo III, mientras que en los operones LEE4 y LEE5 están codificadas las proteínas que son secretadas o introducidas a la célula huésped. Por último, también en el operón LEE5 están las proteínas para llevar a cabo la adhesión íntima o A/E. En el operón LEE1, está codificado el regulador *Ler*, éste tiene homología con H-NS en su extremo carboxilo terminal y actúa como desrepresor en las regiones promotoras de los operones LEE2, LEE3, LEE4 y LEE5 al competir con H-NS por sitios de pegado en el DNA (Sperandio et al. 2000; Bustamante et al. 2001; Bustamante et al. en preparación), donde H-NS parece formar un complejo nucleoproteico que impide la transcripción. *Ler* es regulado positivamente por los reguladores globales IHF y Fis, además de que *PerC* parece actuar como un modulador positivo (Friedberg et al. 1999; Bustamante et al. 2001); por otro lado, H-NS también reprime la expresión de *Ler* (Barba et al. datos no publicados). Recientemente, se ha sugerido que la expresión de *Ler* también está sujeta a regulación tipo "Quorum sensing" (Sperandio et al. 2002).

Por otro lado, no se ha descartado la posibilidad de que haya otras proteínas que también sean introducidas, por medio de la vía de secreción tipo III, a la célula huésped y que pudieran estar codificadas en alguna otra isla de patogenicidad o región del cromosoma.

Por otro lado, la acumulación de  $\alpha$ -actinina no depende de la fosforilación de Tir, pues ésta se une al extremo amino terminal de la proteína (Goosney et al. 2000), en donde también se unen las proteínas ezrina y talina (Freeman et al. 2000; ); siendo ésta última esencial para la formación del pedestal (Cantarelli et al. 2001).

Las proteínas secretadas y translocadas por EPEC son capaces de inducir transducción de señales dentro de la célula huésped (Fig. 1B, 1C, 3). Dentro de éstas se destacan aquellas que resultan en la activación de fosfolipasa C del tipo  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), proteína-quinasa C (PKC) y la elevación de flujos de inositol trifosfato (Crane y Oh, 1997; Foubister et al. 1994; Goosney, et al. 1999). También se ha observado que EPEC dispara la secreción de IL-8 al activar al factor transcripcional NF- $\kappa$ B en células epiteliales T84, lo que aparentemente ocasiona el reclutamiento de células polimorfonucleares al sitio de la lesión (Savkovic et al. 1996, 1997). Aunque pareciera ser contradictorio para la bacteria el que se active la producción de una reacción inflamatoria, se ha visto que varios patógenos lo hacen para incrementar su replicación, sobrevivencia y diseminación (Tato y Hunter, 2002), lo cual aún no es claro en el caso de EPEC.

Por otro lado, y usando el sistema de microarreglos, de Grado y colaboradores (2001) encontraron que la infección de células epiteliales con EPEC causa la desregulación de la expresión de citocinas; además de observar que activa la cascada de transducción de

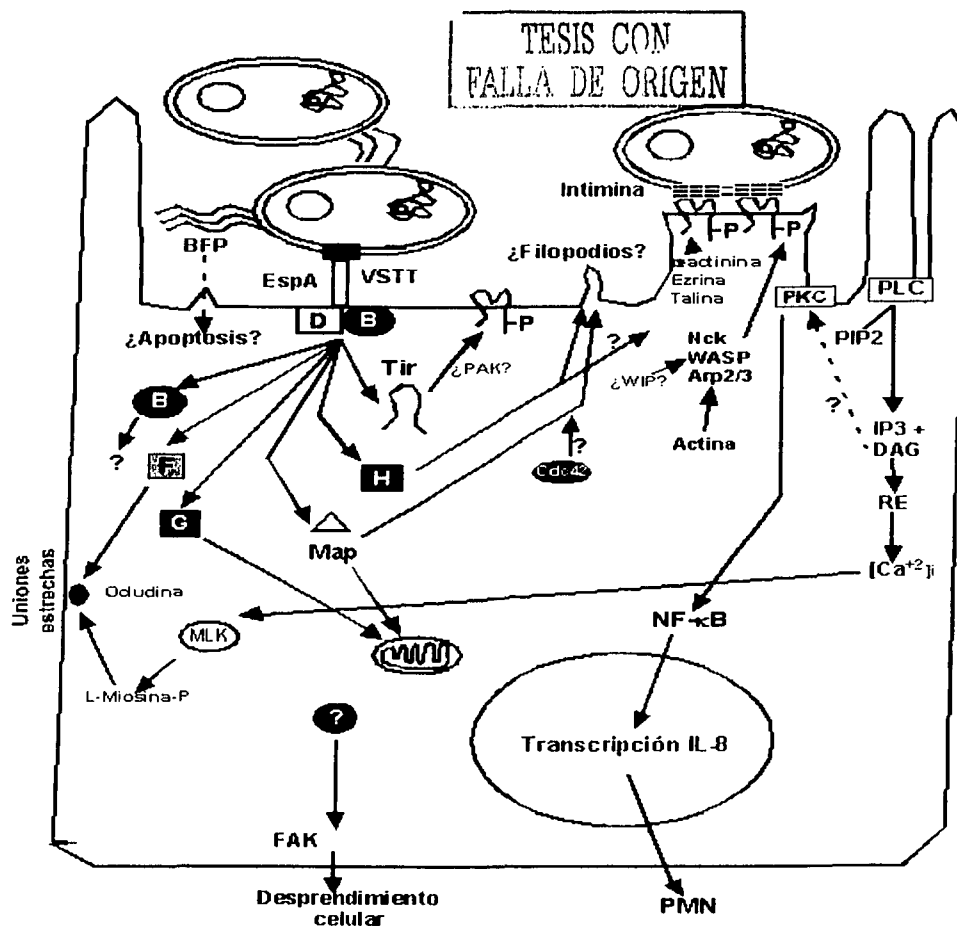


señales de las MAP cinasas (MAPK), específicamente MEK/ERK, que llevan a la expresión del factor de transcripción Egr-1. Éste participa en los procesos de proliferación celular, lo cual podría estar impidiendo que la célula huésped entre en apoptosis una vez que EPEC se ha unido a la superficie celular.

La activación de la vía de las MAPK, según otros autores, también incluye la activación de ERK1/2, p38 y JNK, lo que deriva en la producción de IL-8, fenómeno que, aparentemente, no está involucrado en el proceso de señalización que lleva a la formación de la lesión A/E (Czerucka et al. 2001).

EPEC no sólo entra en contacto con células epiteliales, también se encuentra con células del sistema inmune del huésped. Recientemente, se describió que EPEC es capaz de impedir su fagocitosis por macrófagos al inhibir a la enzima fosfoinosítido-3-cinasa (PI3K), a través de un mecanismo dependiente de la vía de secreción tipo III, pero independiente de Tir (Celli et al. 2001).

Ya se ha mencionado que EPEC recluta proteínas del citoesqueleto debajo del sitio en donde se establece la interacción íntima-Tir. Hay otras proteínas que también son incorporadas, entre éstas están: CrkII, Grb2 (adaptadora), ADF/cofilina (nucleadora de actina), LPP, p130<sup>cas</sup> (fosfatasa para adhesiones focales), Shc (adaptadora), gelsolina, CD44 (correceptor de membrana), calpacina, zyxina y vinculina (nucleación de actina) (Goosney et al. 2001). De éstas, CD44 y calpacina se unen al sitio de adhesión de manera independiente de Tir. Las otras parecen unirse aun cuando Tir no es fosforilada, lo que sugiere que esta unión se establece con el extremo amino de la proteína o con alguna de las otras proteínas que se unen a esta región.



**Figura 3.** Transducción de señales ocasionada por EPEC en la célula huésped. Las proteínas efectoras son introducidas por EPEC a través de la vía de secreción tipo III (VSTT). Tir es fosforilada en el interior de la célula huésped y se inserta en la membrana donde se une con la intimina. Tir es capaz de nuclear componentes del citoesqueleto, como son actina,  $\alpha$ -actinina, talina, ezrina, entre otras. Una vez que Tir es fosforilada es capaz de reclutar a la proteína adaptadora Nck, la cual, a su vez, recluta a N-WASP y Arp2/3, las cuales son las responsables de la nucleación de actina. Uno de los cambios originados es la activación de PKC que puede estimular la salida de iones  $Cl^-$ . La activación de PLC $\gamma$  origina la producción de inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y de diacil glicerol (DAG), que estimulan la salida de calcio de la pozas internas sensibles a estos compuestos. Por otro lado, la infección con EPEC activa al activador transcripcional NF- $\kappa$ B que inicia la transcripción de interleucina 8 (IL-8), la cual origina una respuesta inflamatoria.

(Fig. 3 continuación) La fosforilación de las cadenas ligeras de miosina (MLC) lleva al rompimiento de las uniones estrechas con células vecinas. Las proteínas efectoras (EspA, B, D, F, G, H, Map) originan diversos cambios dentro de la célula huésped: EspF favorece el rompimiento de uniones estrechas; Map origina cambios en el potencial de membrana de la mitocondria, mientras que EspG los contrarresta; además, Map favorece la formación de filopodios, lo cual, a su vez, es contrarrestado por EspH. Aún no se ha definido que factores bacterianos son los responsables de alterar las adhesiones focales (FAK), lo que lleva al desprendimiento celular. A pesar de todo este conocimiento, aún no se sabe cuales de estos cambios originan la diarrea. (Esquema tomado de Puente y Finlay, 2001, y modificado con la citas mencionadas en el texto).

Por otro lado, al parecer el BFP no sólo interviene en las interacciones bacteria-bacteria y bacteria-célula huésped, ya que es capaz de inducir apoptosis (muerte celular programada) en diversos tipos celulares, incluido uno de origen intestinal (Abul-Milh et al. 2001). Los mecanismos celulares que son activados y el papel de este proceso en el mecanismo de patogenicidad, aún no se determinan. Además, se deberá determinar si los niveles de BFP producidos *in vivo* son suficientes para llevar a ocasionar este daño.

Cabe destacar que a pesar de lo antes descrito, aún no se sabe en su totalidad qué proteína efectora es la responsable de cada uno de los cambios mencionados, y tampoco se sabe cuál es el origen de la diarrea ocasionada por la infección con EPEC.

### 1. 1.3 El pilus BFP

El pilus BFP es responsable de la formación de la adherencia localizada (también llamada inicial) y es un factor de virulencia importante para ocasionar diarrea. Este pilus pertenece a la familia de los pili tipo IV (Girón et al. 1991; Bieber et al. 1998).

Los pili tipo IV están ampliamente distribuidos entre las bacterias patógenas para animales y plantas. Estos se caracterizan por ser filamentos largos que se relacionan con la capacidad de adhesión, movilización del tipo "social" y del tipo retráctil, y en la formación

de biopelículas. Están localizados generalmente en el polo de la bacteria, se componen de una sola pilina que tiene un residuo de N-metil-fenilalanina en el inicio de la proteína madura, tienen un dominio amino terminal hidrofóbico altamente conservado y son de 6 a 7 nm de grosor y de longitud variable, además de ser relativamente flexibles (Hobbs y Mattick, 1993; Fernández y Berenguer, 2000; Shi y Sun, 2002).

El pilus "formador de haces" ("bundle-forming pilus"), tiene 7 nm de diámetro y es capaz de formar filamentos muy largos que se entrecruzan y mantienen unidas a las bacterias de la microcolonia (Fig. 1A) (Girón et al. 1991; Vuopio-Varkila y Schoolnik, 1991; Knutton et al. 1999).

Para la biogénesis y regulación del BFP se requiere de los genes del operón *bfp* (compuesto por 14 genes, Fig. 4) y del operón *perABC* (*bfpTVW*), respectivamente (Sohel et al. 1996; Stone et al. 1996; Gómez-Duarte y Kaper, 1995; Tobe et al. 1996), además del gen cromosomal *dsbA* (necesario para la formación de puentes disulfuro en el espacio periplásmico) (Zhang y Donnenberg, 1996). El gen estructural de la subunidad principal del BFP (*bfpA*), y primero del operón *bfp*, sólo se expresa durante la fase exponencial de crecimiento a 37°C en medios de cultivo para células eucariotes, por ejemplo, DME ("Dulbecco's modified Eagle's medium"). A su vez, su expresión es fuertemente disminuida a temperaturas por arriba y por debajo de los 37°C y en presencia de sales de amonio (Puente et al. 1996). Casi todas las proteínas codificadas en el operón tienen homología con otros sistemas que sintetizan este tipo de pilus (Tabla 1). El papel de algunas de las proteínas codificadas en el operón *bfp* se describe a continuación:

**BfpA**, es la subunidad principal del pilus (Girón et al. 1991; Soheli et al. 1993).

**BfpP**, es una peptidasa que se localiza en el espacio periplásmico y que tiene que ver con el procesamiento de BfpA, es homóloga a otras peptidasas dentro de los pili tipo IV (Zhang et al. 1994; Sohel et al. 1996).

**BfpB**, es una lipoproteína que se ha involucrado con la vía de secreción tipo II *sec*-dependiente. Al ser mutada no afecta la formación del BFP, pero sí la adherencia localizada y la autoagregación. Se localiza en la membrana externa de la bacteria y se postula que está involucrada en la interacción de BFP con la célula huésped (Ramer et al. 1996).

**BfpF**, tiene similitud con proteínas con afinidad por nucleótidos y al ser mutado aumenta la densidad bacteriana en la microcolonia y la adherencia a la célula eucariote, pero no es necesario para la producción y procesamiento de la pilina (Anantha et al. 1998; Ramer et al. 2002). Una mutante en este gen administrada a pacientes voluntarios resultó atenuada en comparación con la cepa silvestre (Bieber et al. 1998).

**BfpD**, también tiene similitud con proteínas con afinidad por nucleótidos y al ser mutada afecta la expresión del BFP, y por lo tanto la adherencia localizada y la autoagregación, por lo que se requiere para la biogénesis del pilus (Bieber et al. 1998). Se sugiere que tanto BfpD y BfpF proveen de energía al sistema de ensamblaje del BFP mediante la hidrólisis de ATP (Sohel et al. 1996).

**BfpE**, tiene una identidad de entre 21 y 28% (47% de similitud) con PulF y otras proteínas involucradas en la vía de secreción *sec*-dependiente que carecen de péptido señal, pero que están asociadas a la membrana citoplasmática (Sohel et al. 1996).

**BfpH**, posee un sitio conservado involucrado en el procesamiento de lipoproteínas, pero carece de homología con otras proteínas de la vía de secreción tipo II (Sohel et al. 1996). Una mutación en el gen *bfpH* no afectó ni la expresión, ni la biogénesis del BFP (Anantha et al. 2000).

Tabla 1. Proteínas homólogas a las codificadas en el locus *hfp*\*

<i>Función</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Genes</i>	<i>Proteínas**</i>
Biogénesis del pilus tipo IV	EPEC (B171-8 y E2348/69)	<i>hfp</i>	A B C D E F P H I J K L M
	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>tcp</i>	A C T E E J
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>pil</i>	A B,T C U,T D V V V
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>pil</i>	E F D A
	<i>Dichelobacter nodosus</i>	<i>fim</i>	A,B A,B B
Sistema de secreción tipo II	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>pul</i>	D E F E O H I,J
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>xcp</i>	R S R A T T,V
	<i>Erwinia spp</i>	<i>out</i>	D E F E O H I,G
	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>xps</i>	D E F E G I

\*. Tomada de Sohel et al. 1996.

\*\*.. La homología es con base en la similitud de la secuencia de aminoácidos predicha para cada gen, y en algunos casos por evidencias de una función conservada. Cada proteína homóloga se indica debajo de la proteína correspondiente al locus *hfp*. Detalles de algunas de las proteínas se mencionan en el texto.

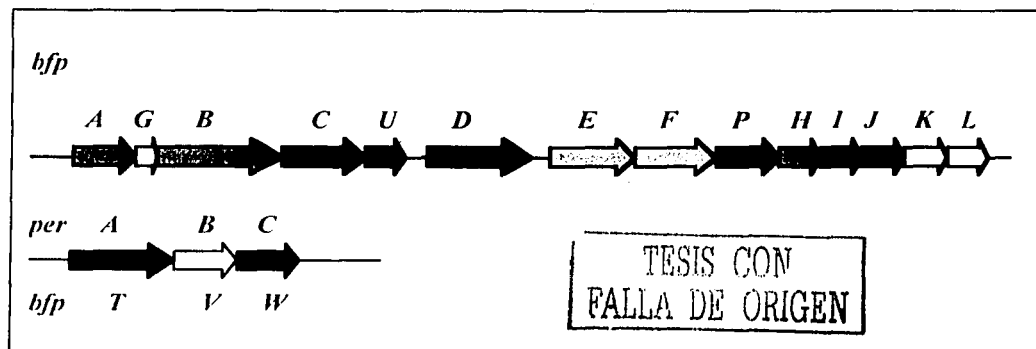


Figura 4. Organización de los operones *hfp* y *per* en el plásmido EAF.

**BfpG y BfpC**, no tienen homología con alguna proteína en otros sistemas de pili tipo IV, parecen no tener un papel en la expresión y procesamiento de la pilina, pero sí en la biogénesis y en la formación de la adherencia localizada (Ramer et al. 2002). También las proteínas BfpL y BfpM carecen de homología (Sohel et al. 1996).

**BfpIJK**. Estas proteínas tienen homología con la proteína estructural BfpA.

**BfpU**. Es una proteína de 17 kDa que se localiza tanto en el periplasma como en el citoplasma de la bacteria. Una mutación en éste gen afecta el fenotipo de adherencia localizada. Probablemente forma parte de la maquinaria para el ensamblaje del pilus (Schreiber et al. 2002).

Recientemente, se realizó un estudio exhaustivo sobre la síntesis y actividad de cada uno de los genes del locus *bfp* (Ramer et al. 2002). En éste, se demostró que cada uno de los genes codifica para una proteína y que para la biogénesis y para el fenotipo de adherencia localizada sólo son necesarios 12 de los 14 genes (sólo *bfpF* y *bfpH* no son necesarios). Se postula que se forma un complejo en la membrana interna formado por BfpI, -J y -K las cuales interaccionan con BfpA, -E y -L; mientras que en la membrana externa se encuentra un componente similar a una secretina, formado por BfpB y BfpG. BfpU y BfpL parecen formar un canal en el periplasma que conecta a los dos componentes membranales.

#### **I. 1.4 Regulación de los genes de virulencia en EPEC.**

No es suficiente que una bacteria patógena contenga islas de patogenicidad o genes involucrados con virulencia para garantizar que pueda infectar a una determinada célula; es necesario que estos genes se expresen en el momento adecuado bajo condiciones que aseguren la asociación bacteria-célula huésped (Edwards y Puente. 1998). El caso de EPEC

no es la excepción, sus genes están sujetos a una cascada de regulación que aún no ha sido completamente identificada. En esta sección se describirá el mecanismo de regulación de los genes de los operones *bfp* y *per*; la regulación de los demás genes, incluidos los del LEE, se menciona brevemente en la figura 5.

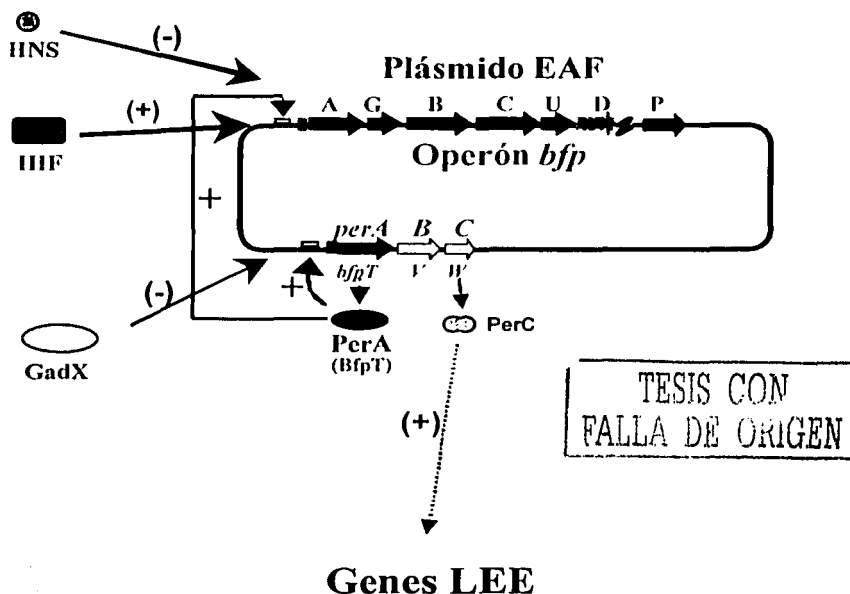
La expresión del BFP ocurre preferentemente durante la fase exponencial de crecimiento en medio de cultivo para células eucariotes a 37°C, como el DME (Puente et al. 1996) (Fig. 5). En presencia de sales de amonio, o a temperaturas por arriba o por debajo de los 37°C, su expresión se regula negativamente. El responsable de la regulación positiva es el producto del gen *perA* (*bfpT*), que se encuentra codificado en un operón localizado 18 kpb río abajo del operón *bfp* (Tobe et al. 1996; Gómez-Duarte y Kaper, 1995). Este operón contiene 3 genes, *perABC* (*bfpTVW*), de los cuales sólo el primero tiene homología con algún gen previamente descrito. Tanto *perB*, como *perC*, son traducidos, pero no son necesarios para la expresión del BFP o de PerA. Sólo PerC parece tener un papel como modulador positivo de la transcripción del operón LEE1, donde se encuentra codificado Ler (Sosa-Macias, 1999; Bustamante et al. 2001).

PerA tiene similitud con la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS y será descrito en detalle más adelante. La expresión de los genes del operón *per* también es regulada por PerA y se regula en las mismas condiciones ambientales y composición del medio que el operón *bfp* (Martínez-Laguna et al. 1999).

El papel del operón *perABC* (*bfpTVW*) no se restringe a regular la expresión del pilus, ya que se ha involucrado en la regulación de genes de virulencia en el cromosoma de EPEC (*cae*, *espA*, *espB*, *tir*, *ler* y *trcA*), lo que hace pensar que este locus podría actuar como un regulador global de virulencia en EPEC (Figs. 4 y 5) (Gomez-Duarte y Kaper,



1995; Kenny et al. 1997a, 1997b; Knutton et al. 1997; Mellies, et al. 1999; Tobe et al. 1999b, Bustamante et al. 2001).



## Genes LEE

Figura 5. En el esquema se representan los genes para la biogénesis del BFP, los cuales están contenidos en el operón *bfp*, y el operón regulador *perABC*. Para la expresión de *bfpA*, y de los genes río abajo, se requiere de la expresión de *perA*, que a su vez se autoactiva. La expresión óptima ocurre a 37°C en medio de cultivo celular DME. Al activar PerA su propio promotor, favorece la expresión de *perB* y *perC*, este último parece actuar como un modulador positivo de la expresión del gen regulador *ler* en la isla LEE, el cual, a su vez, regula positivamente a los diversos operones de esta isla (Fig. 2). Para la expresión de *bfpA* se requiere del regulador global IHF, lo que no ocurre para el gen *perA*. Estudios recientes realizados en el laboratorio, han demostrado que HNS actúa como regulador negativo a bajas temperaturas en ambos operones (Ibarra et al, dato no publicados). Por último, Shin et al. (2001) demostraron que GadX, también miembro de la familia AraC y regulador positivo de genes para resistencia a cambios de pH, reprime parcialmente la expresión de *perA* a pH ácido.

### 1.1.5 El regulador PerA (BfpT)

El gen *perA* (*bfpT*) codifica para una proteína de ca. 31.8 kDa, la cual pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS, a la que pertenecen varios reguladores de factores de virulencia como VirF de *Shigella flexneri*, Rns, FapR y CfaD en diferentes cepas de *E. coli* enterotoxigénica y AggR de *E. coli* enteroagregativa. Dentro de esta extensa familia, también encontramos reguladores de genes para metabolismo, como son AraC para la utilización de arabinosa; XylS, utilización de alquilbenzoatos; MelR, de melobiosa, entre otros; además de reguladores de genes para sobrevivencia en condiciones de estrés, como SoxS, MarA y Rob (Gallegos et al. 1997).

Los reguladores del tipo AraC comparten similitud en el extremo carboxilo terminal, donde se encuentran dos probables dominios de unión a DNA del tipo HTH ("α-helix-turn-α-helix", α-hélice-vuelta-α-hélice) y un posible dominio de unión a la RNA polimerasa (RNAP), mientras que la homología en el extremo amino terminal es mucho menor (Gallegos et al. 1997; Bhende y Egan, 2000; Kaldalu et al. 2000). En el caso de AraC, se ha demostrado que el dominio amino terminal tiene la capacidad de unir arabinosa. Esta unión parece inducir cambios conformacionales de la proteína, lo que determina las diferentes afinidades a los operadores en el promotor *paraBAD*. Este dominio también es responsable de la formación de homodímeros, lo cual es un proceso importante para su funcionalidad y que parece conservarse en varios miembros de la familia que regulan a genes para el metabolismo de carbono y nitrógeno. La interacción con moléculas inductoras no es exclusiva de AraC, hay otros reguladores del metabolismo bacteriano que activan la expresión de genes sólo cuando estas moléculas se encuentran presentes, por ejemplo, MelR, RhaR, RhaS, XylS y UreR. Los datos anteriores sugieren que en los demás

miembros de esta familia, el dominio amino terminal podría estar involucrado en la formación de dímeros, o en la detección de señales químicas, o ambas, o bien, en unirse a otras proteínas que colaboren en la regulación favoreciéndola u obstruyéndola (Gallegos et al. 1997). Como un ejemplo de esto último, recientemente, se describió que InvF, un regulador de la citada familia, requiere de la asociación con la chaperona SicA para poder unirse a DNA y activar genes de la isla de patogenicidad I de *Salmonella* (Darwin y Miller, 2001). Otro ejemplo es el de HilD, activador de *hilA* en la isla de patogenicidad I de *Salmonella typhimurium*, el cual es regulado negativamente por la interacción con HilE (Baxter et al. 2003).

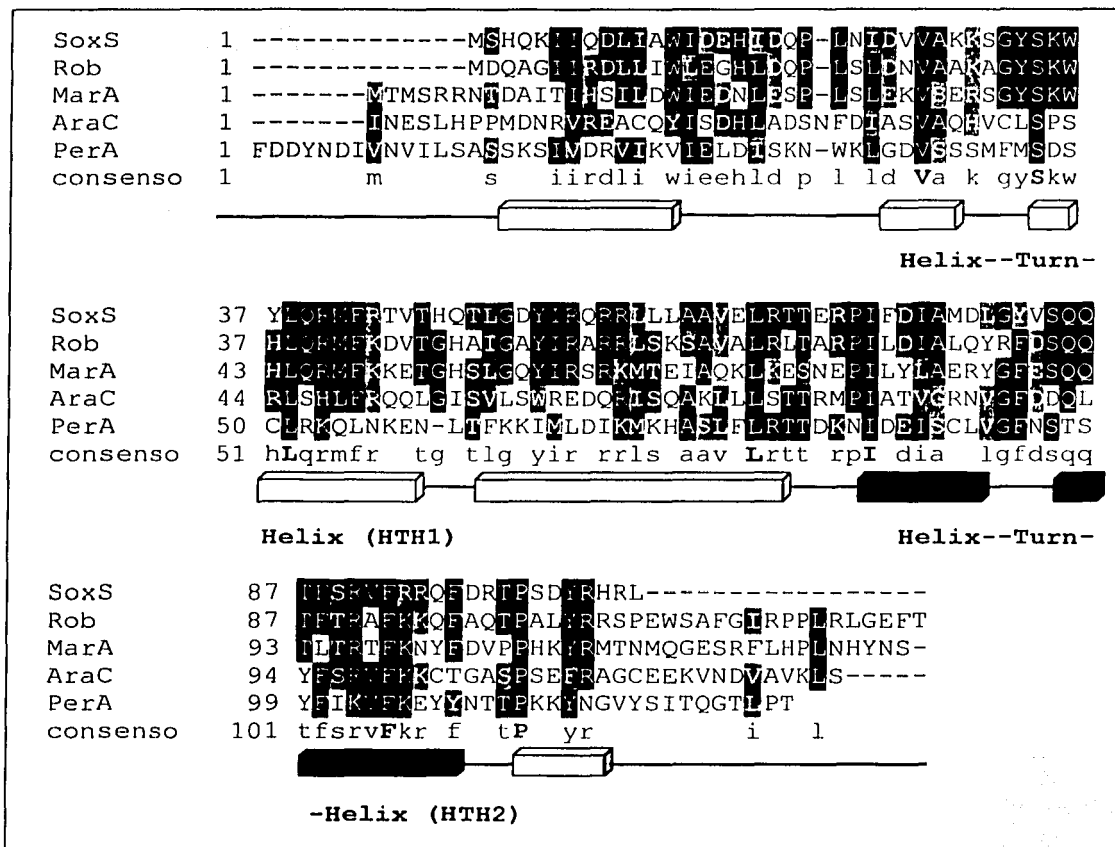
Una comparación del tipo BLAST de PerA con AraC, mostró que comparten un 21% de similitud, siendo más marcada hacia el extremo carboxilo terminal donde se encuentran las dos regiones HTH (Tobe et al. 1996) (Fig. 6). El análisis del dominio amino terminal de PerA por separado, a través de una búsqueda en bases de datos del tipo FASTA, no mostró similitud con alguna proteína; así mismo, la búsqueda de dominios con el programa PRODOM no generó ningún resultado (datos no mostrados).

Como se señaló anteriormente, la expresión de *bfpA* y *perA* es modulada negativamente por la presencia de amonio en el medio de cultivo. Una posibilidad era que PerA detectase de manera independiente la presencia de amonio mediante el dominio amino terminal. Lo anterior se descartó con la observación de que en *E. coli* K12 (cepa MC4100 conteniendo *perA* y una fusión transcripcional *bfpA-cat*) no se reproduce la regulación negativa, sugiriendo que se requiere de un factor presente en EPEC y no en *E. coli* K12 (Bustamante, V.H., tesis de doctorado; Martínez-Laguna et al. 1999). Dicho factor podría competir con PerA por el promotor de *bfpA* y *perA* o unirse al dominio amino

terminal en presencia de amonio y así alterar su interacción con los promotores de ambos genes.

Recientemente, se han encontrado otras proteínas involucradas en la regulación de *perA* y *bfpA* (Fig. 5). Shin et al. (2001) describieron otro miembro de la familia AraC, GadX, que parece actuar como represor de la expresión de *perA* a pH ácido, además de ser el activador positivo de los genes *gad*. Presumiblemente, este regulador se une en la región río abajo del promotor y dentro del gen estructural, con lo que impediría la transcripción (Shin et al. 2001). Se propone que la regulación por pH le indicaría a la bacteria cuando se han rebasado los jugos gástricos del estómago y ha ingresado al intestino delgado.

Recientemente, en nuestro laboratorio se encontró que el regulador global IHF es necesario para la expresión de *bfpA*, pero no de *perA* (Martínez-Laguna et al. en preparación). Actualmente, se estudia la interacción de IHF con la región promotora de *bfpA* para definir si existen diferencias entre el mecanismo de acción de PerA al activar sus promotores blanco.



**Figura 6.** Alineamiento del extremo carboxilo de PerA con las proteínas SoxS, MarA, Rob y AraC. Los rectángulos debajo de la secuencia muestran  $\alpha$ -hélices, los blancos señalan las secuencias involucradas con el dominio HTH1 y los negros en el HTH2, su nombre se indica debajo. La secuencia consenso se indica en la última línea y en negras se resaltan los residuos conservados. La estructura secundaria fue verificada por cristalografía para MarA y Rob, y coincide con las propuestas para AraC, SoxS y PerA con el programa ProDom. La identidad entre PerA y AraC en esta porción es del 21% y la similitud del 32% (Tomada de Kwon et al. 2000, y modificada con el resultado del análisis de las secuencias con el programa ProDom).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## II. Antecedentes.

Estudios previos sobre la regulación de *bfpA* demostraron que la región mínima necesaria para su expresión comprende hasta la posición -85 (Bustamante et al. 1998), mientras que para *perA* comprende hasta la posición -81 (Martínez-Laguna et al. 1999). Al hacer un alineamiento de ambas regiones se observó que había una identidad del 73 % entre las regiones -85 a -46 de *bfpA* y -64 a -26 de *perA*, además de ser ricas en residuos A y T, por lo que se postuló que podría ser el sitio de pegado de PerA (Bustamante et al. 1998; Martínez-Laguna et al. 1999).

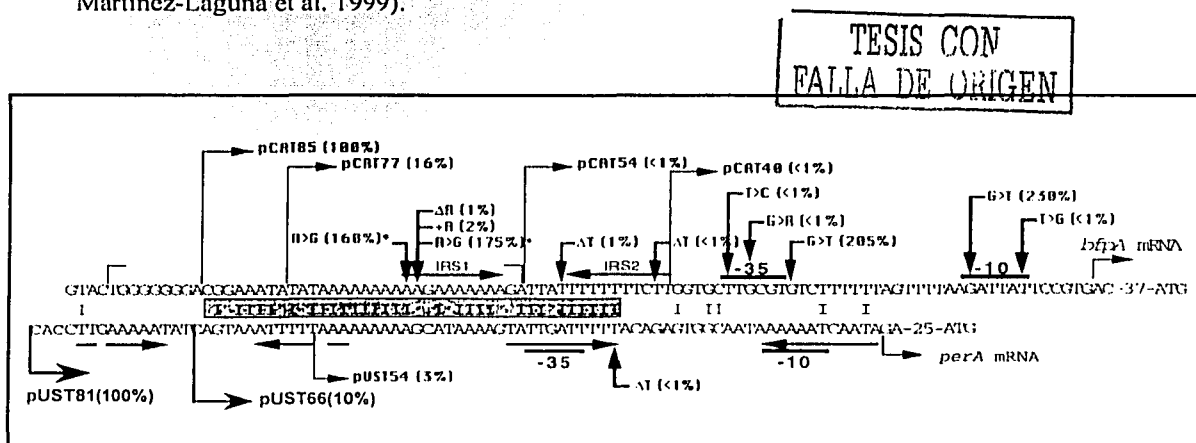


Figura 7. Alineamiento de las regiones promotoras de *bfpA* y *perA*. Las flechas y los números indican la posición hasta donde se hizo la fusión transcripcional al gen *cat*, los porcentajes entre paréntesis indican la actividad de dicha fusión con respecto a la fusión más larga (tomado de Bustamante et al. 1998 y modificado de acuerdo a Martínez-Laguna et al. 1999)

Con base en el papel central que tiene PerA en activar la expresión de BFP, la suya propia y posiblemente la de otros factores de virulencia, el proyecto se enfocó en purificar la proteína PerA para determinar como interactúa sobre los promotores que regula. Así mismo, en determinar si como parte del mecanismo de activación ocurre la dimerización de PerA.

### III. Hipótesis.

PerA se unirá a las regiones previamente propuestas como sitios de unión y que comparten 73% de homología entre las regiones reguladoras de *bfpA* y *perA*. Dada su similitud con proteínas de la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS, PerA reconocerá dichas secuencias en forma dimérica.

### IV. Objetivos.

#### IV.1 Objetivo general.

Estudiar los mecanismos moleculares mediante los cuales PerA regula la expresión de la fimbria BFP.

#### IV.2 Objetivos específicos.

- Determinar el sitio de unión de PerA (BfpT) a las regiones reguladoras de *bfpA* y *perA*.
- Analizar la posible interacción proteína-proteína entre monómeros de PerA.

#### IV.3 Objetivos experimentales.

1. Purificar PerA como fusión a la proteína unidora de maltosa (MalE o MBP).
2. Producir anticuerpos dirigidos contra un péptido de la región carboxilo-terminal de PerA.
3. Realizar experimentos de interacción proteína-DNA como son: protección a DNasa I y cambios en la movilidad electroforética de las regiones promotoras de los genes *bfpA* y *perA*.
4. Determinar la región mínima de pegado de la fusión MBP-PerA con experimentos de retardo en gel con oligonucleótidos de doble cadena.
5. Analizar posibles interacciones proteína-proteína con un sistema bacteriano basado en LexA y una fusión reportera *sulA-lacZ*.
6. Analizar el posible efecto de dominancia negativa al sobreexpresar el extremo amino terminal de PerA

## **Materiales y métodos**

### ***Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.***

Las cepas y los plásmidos usados en este estudio se enlistan en la tabla 2. Para el crecimiento de las cepas se usó el medio de cultivo de Luria (LB), y el medio para cultivo de células eucariotes DME ("Dulbecco's Modified Eagle Medium", Gibco-BRL) suplementado, según fuera el caso, con carbenicilina o ampicilina (100 µg/mL), gentamicina (5 µg/mL), tetraciclina (12 µg/mL) y kanamicina (30 µg/mL).

### ***Oligonucleótidos.***

Los oligonucleótidos usados se solicitaron a la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología-UNAM y se presentan en la tabla 3. Todos los oligonucleótidos usados en los ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) se purificaron por electroforesis en poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (urea 8 M), cluidos del gel en agua a 42°C y desalados con columnas Microcon (Millipore). Los oligos usados para las reacciones de PCR y secuencia se diluyeron a una concentración de 25 µM.

Los iniciadores usados en el EMSA, en la secuenciación de genes y en la obtención de fragmentos de PCR para el ensayo de protección a DNasa I ("footprinting"), se marcaron con [<sup>32</sup>P]-γATP y con la enzima T4 polinucleótido cinasa (Amersham) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.



### ***Construcción del plásmido pMALT2***

El gen *perA* se amplificó con los oligos BFPT7BHI-Fw y TAFB-2862R (Tabla 3) usando la enzima *Taq* Gold (Perkin Elmer) y como molde el plásmido pCST (Tabla 2). El fragmento de DNA y el plásmido pMALC2xa (New England) se digirieron con las enzimas *Bam*HI-*Pst*I (Roche). La ligación se realizó con la enzima T4 DNA ligasa (Promega), en una proporción 1:3 (vector:inserto), a 16°C por toda la noche y se transformó en la cepa de *E. coli* MC4100. Los plásmidos pMALT2 resultantes se caracterizaron por digestión y se secuenciaron para verificar la correcta fase de la fusión *malE-perA*.

### ***Expresión y purificación de MBP-PerA.***

La expresión y purificación de MBP-PerA se realizó como se ha descrito previamente para otras proteínas de la familia AraC/XylS (Munson y Scott, 1999; Fawcett y Wolf Jr, 1994). La cepa *E. coli* BL21 pLys7 se transformó por el método de cloruro de calcio con el pMAL-T2 y se cultivó en LB con glucosa al 0.2% y 100 µg/mL de carbenicilina o ampicilina a 30°C en un baño agitado. La expresión de MBP-PerA se indujo al adicionar IPTG a una concentración final de 0.3 mM cuando el cultivo alcanzó una  $DO_{600}=0.5-0.7$ . Después de la inducción, el cultivo se incubó por otras 3 horas; posteriormente, se centrifugó y la pastilla se guardó a -70°C toda la noche. Esta se lavó una vez con regulador de columna frío (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoctanol 10 mM) y concentrado 100 veces con el mismo regulador. Las células se rompieron por cavitación con pulsos de 30 segundos por 4 minutos. El extracto crudo se obtuvo después de centrifugar a 14,000 x g por 30 min a 4°C.

El extracto crudo se diluyó 1:5 en regulador de columna y se filtró a través de una columna de resina de amilosa (New England Biolabs). Se dieron lavados con 100 volúmenes de columna y la proteína se eluyó con el mismo regulador de columna adicionado con maltosa 10 mM colectando fracciones de 1 mL. La proteína purificada y los extractos se analizaron en un gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE). La concentración de proteína se determinó por la técnica de Bradford, al mismo tiempo que una curva de concentración con albúmina sérica bovina (BSA).

### *Anticuerpos*

Se obtuvieron anticuerpos contra el extremo carboxilo terminal de PerA. Para esto, a partir de la secuencia de aminoácidos predicha para la proteína (Fig. 6) (Tobe et al. 1996), se diseñó un péptido de 15 aminoácidos de los residuos 260 al 274 al cual se le adicionó un residuo de glicina y uno de cisteína en el extremo amino para favorecer la solubilidad y el acoplamiento con la proteína acarreadora, respectivamente. La secuencia del péptido PerACOOH fue:



El péptido se acopló a BSA por entrecruzamiento de tipo disulfuro con el reactivo SPDP (N-succinidimil 3-[2-piridilditio] propionato, Pierce) de acuerdo a lo descrito por Alagón y King (1980). El acoplamiento tuvo una eficiencia de 49.4 % al unirse 7.9 moles del péptido por mol de BSA.

Dos conejos de la raza New Zealand se inmunizaron con 200  $\mu\text{g}$  del complejo BSA-PerACOOH en un esquema semanal por 2 meses y medio y se les realizó un seguimiento de la producción de anticuerpos por la técnica de ELISA. Después de 13 semanas, se

sangraron los conejos en blanco y se obtuvo el suero. El título de los anticuerpos obtenidos se determinó por *ELISA* y su eficacia para reconocer PerA y MBP-PerA se determinó por "Western blot".

Los anticuerpos anti-MBP se obtuvieron de la compañía New England Biolabs, los anti-DnaK de Roche, los anti-conejo y anti-ratón acoplados a peroxidasa (HRP) de Biomeda, los anti-LexA de Invitrogen y los anticuerpos anti-BfpA fueron amablemente proporcionados por el Dr. Jorge Girón de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

### *ELISA*

El seguimiento de la producción de anticuerpos en los conejos se realizó por el ensayo de detección de inmunoabsorbente (*ELISA*). En éste, se "sensibilizaron" placas de 96 pozos (Nunc) con 100  $\mu$ L por pozo de una solución de 5  $\mu$ g/mL de la proteína BSA o del conjugado BSA-PerACOOH en regulador de unión (carbonato/bicarbonato de sodio 100 mM pH 9.5) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se dieron tres lavados con TBS-Tween 20 (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05%) y se bloqueó con 200  $\mu$ L por pozo de una solución de gelatina al 0.5 % en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 Tween 20 0.05% durante 2 horas a 37°C. Después, se dieron tres lavados, como ya se mencionó, y se procedió a hacer diez diluciones seriadas 1:30 del suero en la solución reguladora "vehículo" (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, Tween 20 0.05%) de cada uno de los conejos por duplicado. La placa se incubó a temperatura ambiente por 1 hora y después se lavó 3 veces con regulador de lavado. A cada pozo se le adicionaron 100  $\mu$ L del anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa diluido en regulador vehículo y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Por último, se dieron tres lavados y la reacción se reveló

con el sustrato ABTS (Roche), la reacción se detuvo con SDS al 5 % o con ácido fluorhídrico concentrado y se obtuvo la absorbancia a 405 nm. Los datos de absorbancia se graficaron y se calculó el título del suero de cada conejo.

### ***Ensayo de adherencia***

El ensayo de adherencia se realizó como se ha descrito previamente, con algunas modificaciones (Cravioto et al. 1979; Puente et al. 1996). Las bacterias se cultivaron en LB durante toda la noche en agitación a 37°C, después se diluyó 1:50 en medio DME suplementado con LB al 1% y se incubó en las mismas condiciones por 3 horas más. De este cultivo se administraron 100 µL a cada pozo de una placa de 24 pozos previamente preparadas con una monocapa de células HeLa sobre cubreobjetos circulares. Las placas ya inoculadas se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % por 3 horas. Las bacterias no adheridas fueron removidas con tres lavados de PBS, las preparaciones se fijaron con metanol absoluto frío y se tificaron con colorante Giemsa. Los cubreobjetos se colocaron sobre resina en portaobjetos y se observaron en un microscopio óptico.

### ***Inmunodetección ("Western blot").***

Las bacterias se obtuvieron cultivándolas en LB por toda la noche y después subcultivando en medio DME e incubando en un baño agitado a 37°C hasta que alcanzaran una DO<sub>600</sub> de 1.0. De este crecimiento se obtuvo 1 mL, se centrifugó a 14.000 x g y la pastilla se resuspendió en regulador de corrimiento para proteínas. Las muestras se hirvieron por 5 minutos y se aplicaron en un gel de poliacrilamida al 12 %; posteriormente, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm de poro (Amersham) en una

cámara de transferencia húmeda (BioRad). La membrana se bloqueó con leche descremada al 5 % (Carnation) en regulador TBS-Tween por al menos una hora a temperatura ambiente y en agitación. Después, se incubó toda la noche con una dilución del anticuerpo primario (anti-PerA, 1:1000 ó 1:500, anti-BfpA, 1:10,000, anti-MBP, 1:15,000, anti-LexA, o anti-1:5000, anti-DnaK, 1:50,000, según fuera el caso) a temperatura ambiente en agitación. La membrana se lavó 3 veces por 10 minutos con TBS-Tween y se le adicionó una dilución 1:20,000 del anticuerpo secundario (anti-conejo o anti-ratón) acoplado a peroxidasa (Biomeda), se incubó 1 hora y, por último, se dieron otra vez 3 lavados con TBS-Tween. El revelado de la membrana se realizó con el estuche comercial de quimioluminiscencia Chemi-Glow (Alpha Innotech) y se observó en el Alpha Imager, o se expuso a película fotográfica a diferentes tiempos.

Para el caso de los geles de poliacrilamida nativa, estos se transfirieron en una cámara de transferencia semi-seca (BioRad) y se trataron como ya se describió antes.

### ***Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (“Electrophoretic Mobility Shift Assay”, EMSA).***

**No radioactiva.** Los fragmentos de DNA con la posible región de pegado de PerA se amplificaron por PCR con la enzima *Taq* Gold, se incubaron con diferentes concentraciones de MBP-PerA en regulador de unión (Tris-HCl 8 mM pH 7.9, MgSO<sub>4</sub> 40 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM, KCl 40 mM, EDTA 2 mM pH 8.0, glicerol 24 %) por 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se aplicaron a geles de agarosa al 2 % en TBE, o de acrilamida-bisacrilamida (30%-2%) nativa al 6% en TBE, y se sometieron a electroforesis a

140 V. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio y se observó en un transiluminador de luz ultravioleta en el aparato Alpha-Imager (Alpha Innotech).

**Radioactiva.** Para estos ensayos de EMSA, 100 ng de los oligonucleótidos se marcaron con fósforo radioactivo como ya se mencionó antes. Estos se acoplaron a su cadena complementaria calentando ambas cadenas a 95°C por 5 minutos, permitiendo un enfriamiento gradual a temperatura ambiente y limpiándolos del exceso de marca libre por filtración en Sephadex G25 o por columnas Microcon (Millipore). La cantidad de radioactividad acoplada por los oligos se determinó en un contador de centelleo (Beckman).

Para el corrimiento de los EMSA se siguió el procedimiento descrito por Santana et al. (2000) con algunas modificaciones. Concentraciones crecientes de MBP-PerA se pusieron en contacto con los oligos de doble cadena marcados radioactivamente (20,000 cpm) en regulador de unión y se permitió su interacción a temperatura ambiente por 30 minutos. Las muestras se aplicaron a geles de poliacrilamida nativa al 5 ó 6 % (acrilamida 30%-bisacrilamida 2%) en TBE 0.5X o TGE (Tris-HCl pH 8, glicina 390 mM, EDTA 2 mM) (Roder y Schweizer, 2001); y se sometieron a electroforesis a 300 V a temperatura ambiente o 4°C, respectivamente. Al término, el gel se secó al vacío y se expuso a una pantalla del Phosphor-Imager o a una película Kodak X-Omat. Cuando se realizó la competencia con el mismo oligonucleótido sin marcar, se adicionaron 50 ó 100 veces la concentración del oligo marcado antes de añadir el mismo.

### *Ensayo de protección de DNasa I ("footprinting")*

Los ensayos de protección a la acción de la enzima DNasa I se realizaron de acuerdo a las técnicas de Oropeza et al. (1999) y Munson y Scott (1999). En resumen, se usó un iniciador marcado con fósforo para amplificar las regiones promotoras de *hfpA* y *perA* por PCR, oligos 2700R y TAFHD3, respectivamente, más sus pares correspondientes 2500F para *hfpA* y TAFCAT55 para *perA*. El producto se filtró por columna Microcon y se cuantificó en un contador de centelleo Beckman.

50,000 a 100,000 cpm de los fragmentos marcados se pusieron en contacto, a temperatura ambiente por 30 minutos, con diferentes concentraciones de MBP-PerA en 40  $\mu$ L de regulador de unión (Tris-HCl 8 mM pH 7.9, MgSO<sub>4</sub> 40 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM, KCl 40 mM, EDTA 2 mM pH 8.0, glicerol 24%, poli-dI-dC 1  $\mu$ g/ $\mu$ L). Después, se adicionaron 40  $\mu$ L de una dilución 10<sup>-5</sup> de DNasa I (Roche), en regulador de DNasa I 2X (Tris-HCl 8 mM pH 7.9, MgSO<sub>4</sub> 40 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM, KCl 40 mM, EDTA 2 mM, glicerol 24%), y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. Al término, se adicionaron 500  $\mu$ L de solución de paro (acetato de amonio 570 mM; alcohol 80%, tRNA 50 $\mu$ g/mL), se agitó en Vortex por 20-30 segundos y se favoreció la precipitación en hielo seco por 10 minutos. Después, se centrifugó a 14,000 x g y la pastilla se lavó dos veces con etanol al 70% frío, se secó al vacío en un Savant y se resuspendió en 6  $\mu$ L de regulador de formamida. Los 6  $\mu$ L se aplicaron a un gel de secuencia al 8 % y el resultado se observó después de secar el gel y exponerlo a una película o al Phosphor-Imager (Molecular Dynamics).

### *Actividad de fusiones transcripcionales.*

La determinación de la actividad de las fusiones transcripcionales al gen *cat* se realizó como se describe en Puente et al. (1996). Las cepas con los plásmidos de las fusiones se cultivaron en 50 mL de LB adicionado de carbenicilina 100  $\mu\text{g/mL}$  en un baño agitado durante toda la noche. Los cultivos se ajustaron a una  $\text{DO}_{600}=1.0$  con PBS y, posteriormente, se adicionó un mililitro a 50 mL de DME y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación a 220 rpm. La curva de crecimiento bacteriano para cada ensayo se determinó por densitometría a 600 nm y se tomaron alícuotas de 1 mL a las D.O. 1.0, 1.2 y 1.4. Las alícuotas se centrifugaron a  $14,000 \times g$  durante 2 minutos, las pastillas se lavaron con regulador TDTT (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, DTT 3  $\mu\text{M}$ ). Los extractos crudos se obtuvieron al congelar a  $-70^{\circ}\text{C}$  y descongelar a temperatura ambiente los cultivos con TDTT Tritón 0.1%, o bien por cavitación por pulsos de ultrasonido, y centrifugar a  $14,000 \times g$  durante 20 minutos. La concentración de proteínas se determinó con el estuche comercial BCA (Pierce) y la actividad de la cloranfenicol acetil-transferasa (CAT) se determinó mediante una cinética de actividad enzimática con acetil-CoA, cloranfenicol y 5,5' ditio-bis(2-ácido nitrobenzónico) (DTNB; Research Organics) en un lector de microplacas computarizado tipo Ceres (Biotek) y el programa KC3. La actividad específica de CAT se determinó dividiendo la actividad obtenida entre la concentración de proteína de cada extracto y se expresó como  $\mu\text{mol/mg/min}$ .



### ***Entrecruzamiento químico de proteínas (“crosslinking”)***

A una solución conteniendo aproximadamente 10 µg de MBP-PerA purificada en un regulador de fosfatos (PBS o fosfato de sodio 15 mM pH 6.5, NaCl 150 mM), se le adicionó tris bipyridil-dicloro rutenio II (Sigma) a una concentración final de 1-25 mM y a partir de entonces se manejó en penumbra. Posteriormente, se adicionó persulfato de sodio a una concentración final de 0.025 mM y la mezcla se expuso a la luz de un foco de 75 W debajo de un filtro de 2 cm de agua a diferentes tiempos de acuerdo a Fancy y Kodadek (1999). La reacción se detuvo al adicionar un volumen similar de regulador de corrimiento para proteínas y congelando en hielo seco. Las muestras se hirvieron por 5 minutos y se cargaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%.

### ***Construcción del plásmido con la fusión al gen *lexA****

El gen *perA* se amplificó con los oligos T-B2-190F y T-KpI-R (Tabla 3) usando la enzima *Taq* Gold (Perkin Elmer) y como molde el plásmido pCST. El fragmento de DNA y el plásmido pSR660 (Daines y Silver, 2000) se digirieron con las enzimas *Bgl*III-*Kpn*I y puestos a ligar con T4 DNA ligasa (Promega), para generar el plásmido pM1660PerA. Por otro lado, también se amplificó el gen *araC* con los oligos AraB y AraK y usando como molde el plásmido pAIaraC, para generar el plásmido pMA660AraC. Las ligaciones se realizaron con la enzima T4 DNA ligasa (Promega), en una proporción 1:3 (vector:inserto), a 16°C por toda la noche y se transformaron en la cepa *E. coli* MC4100. La producción de las quimeras LexA-PerA, LexA-AraC y LexA-H-NS se probó por “Western blot” con anticuerpos anti-LexA y por la complementación en la producción de BFP y de la

adherencia localizada en una mutante insercional *perA::Gm* de EPEC B171-8 y *perA::km* en la cepa E2348/69. La fusión LexA-H-NS fue proporcionada amablemente por el Dr. Victor Bustamante.

### ***Sistema de interacción proteína-proteína.***

Con el fin de explorar la posible interacción (dimerización) entre monómeros de PerA, se utilizó un sistema que permite evaluar interacciones proteína-proteína, el cual está basado en el represor LexA (descrito por Dmitrova et al. 1998 y modificado por Daines y Silver, 2000). El sistema permite determinar interacciones homodiméricas y heterodiméricas al utilizar fusiones entre el amino-terminal de LexA (dominio de unión a una secuencia operadora) y la proteína de interés, la cual, en caso de dimerizar o heterodimerizar con otra proteína, permite la formación de un dímero funcional de LexA el cual reprime la expresión de una fusión cromosomal *sulA-lacZ* en las cepas SU101 y SU202 (Fig. 19) (Dmitrova et al. 1999).

El plásmido pMI660PerA se transformó en la cepa de *E. coli* SU101. Como controles positivos de interacción se usaron los plásmidos p658CAT (Daines y Silver, 2000), pMA660AraC y p658HNS (Bustamante, datos no publicados) en la cepa SU101. Las bacterias se cultivaron en caldo LB suplementado con IPTG 1 mM a 37°C en un baño agitado y se obtuvieron muestras a las  $DO_{600}$  de 0.6, 0.8, 1.0 y 1.4. Las muestras se centrifugaron y las pastillas se utilizaron para determinar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa como se describe en Oropeza et al. (1999).

### *Actividad de $\beta$ -galactosidasa*

Las pastillas se lavaron y resuspendieron en 1 mL de regulador Z 1X ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  60 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  40 mM, KCl 10 mM,  $\text{MgSO}_4$  1 mM). Para la determinación de proteínas se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de la muestra y del control (BSA 0.2 mg/mL) por duplicado en una placa de 96 pozos. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de solución D ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3.4%, NaOH 0.17 N) y 2 mL de solución de tartrato cúprico ( $\text{CuSO}_4$  0.85%, tartrato de sodio y potasio 1.7%), y se incubó en agitación a temperatura ambiente por 10 minutos. Después, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu al 16.9% (v/v), se mezcló y la placa se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se leyó la absorbancia de la placa en el lector de microplacas tipo Ceres y se comparó con una curva estándar previamente establecida (Oropéza et al. 1999).

La determinación de  $\beta$ -galactosidasa se realizó colocando 20  $\mu\text{L}$  de cada muestra por duplicado y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución A (lisozima 0.22 mg/mL, Triton X-100 0.22%, regulador Z 1.6X,  $\beta$ -mercaptoetanol 16 mM) y se incubó a 37°C por 5 minutos. Por último, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de solución B (*o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido, ONPG) y se procedió a leer la absorbancia a 415 nm cada 5 segundos por 3 minutos en el lector de microplacas automatizado (Ceres, Bio-Tek). La actividad específica se obtuvo dividiendo la actividad de la enzima entre la concentración de proteínas.

***Construcción de mutantes de PerA carentes del extremo carboxilo terminal para determinar el probable efecto de dominancia negativa.***

Para la construcción de probables dominantes negativas de PerA se utilizó el plásmido pAITmb21, el cual tiene un sitio de restricción *MluI* al inicio del gen y un sitio *BglII* en el probable conector de la proteína (Ibarra et al. datos no publicados). Este plásmido se digirió con *BglII* y, posteriormente, se trató con la enzima T4 DNA polimerasa (New England Biolabs) para eliminar los extremos 5' y se religó con la enzima T4 DNA ligasa para generar el plásmido pPerA $\Delta$ C5. Con este tratamiento se introdujo una mutación que origina un codón de paro inmediatamente después del conector. Para verificar que la proteína PerA no se sintetizara completa, se realizó una inmunodetección con los anticuerpos anti-PerA. El plásmido pPerA $\Delta$ C5 se transformó en la cepa EPEC E2348/69 con la fusión *hfpA-cat* (pCAT201) y se determinaron los niveles de actividad en DME como ya se ha descrito previamente. Como controles se usaron los plásmidos pMPM-K3 (vector), pCST (*perA*) y pAITdB21 (codifica para PerA con una remoción de los residuos 21 a 29 del extremo amino terminal). Además, se determinó la expresión de BfpA por inmunodetección en las mismas cepas.

Tabla 2. Cepas bacterianas y plásmidos usadas en este trabajo.

Cepa	Características	Fuente o referencia
B171-8	EPEC, O111:NM	Puente et al. 1996.
B171-8 <i>hfpT::Gm</i>	B171-8 <i>hfpT::Gm</i> , Gm <sup>R</sup>	Tobe et al. 1996.
B171-10	Derivada de la cepa B171-8 carente del EAF	Puente et al. 1996.
BL21 pl.ys21	F- <i>ompT (lon) hsdSB (r<sub>gm</sub>)</i> RNAP T7, Cm <sup>R</sup>	Invitrogen.
E2348/69	EPEC, O127:H26, NaI <sup>R</sup>	J.B. Kaper.
E2348/69 <i>perA::Km</i>	Inserción <i>perA::km</i>	Alejandra Vázquez.
JPN15	Derivada de E2348/69 carente del plásmido EAF	J.B. Kaper.
MC4100	F- <i>araD 139 Δ(argF-lac) U169 rpsL150 relA1 flbB 5301 deoC 1 ptsF25 rbcR</i> , Sm <sup>R</sup>	Laboratorio.
KY2263	MC4100 <i>ΔclpPX-lon::Cm</i>	Tomoyasu et al. 2001.
KY2266	MC4100 <i>ΔclpPX-lon::Cm ΔhslVU::Tc</i>	Tomoyasu et al. 2001.
BB2395	MC4100 <i>Δlon146::miniTn10</i> , Tc <sup>R</sup>	Tomoyasu et al. 2001.
SU101	<i>lexA71::Tn5 (Def) sula211 Δ (lacIPOZYA)169/F<sup>+</sup> lac<sup>F</sup>lacZΔM15::Tn9(op+/op+)</i> . <i>E. coli</i> JL1434 para probar el sistema de homodimerización	Dmitrova et al. 1998.
<b>Plásmidos</b>		
pMPM-K3	Vector derivado del pACYC184, Km <sup>R</sup>	Mayer, 1995.
pMalC2xa	Plásmido para fusiones con MBP, Amp <sup>R</sup>	Promega.
pCST	Derivado de pMPM-K3 con el gen <i>perA (hfpT)</i> clonado, Km <sup>R</sup>	Martínez-Laguna et al. 1999; Sánchez-San-Martín, datos no publicados.
pAITxs41	Derivado de pCST y que sólo contiene <i>perA</i> y carece de los sitios de restricción <i>XbaI</i> y <i>BglII</i>	Este trabajo.
pMALT2	Plásmido para la expresión de la fusión MBP-PerA, derivado de pMalC2xa	Este trabajo.
pKK232-8	Plásmido para la construcción de fusiones transcripcionales al gen <i>cat</i> . Amp <sup>R</sup>	Pharmacia Biotech
pCAT201	Derivado del pKK232-8 con la región -201 a +76 del promotor del gen <i>hfpA</i>	Puente et al. 1996
pCAT201+27	Derivado del pCAT201 con un recorte en 3' a la posición +27	Bustamante et al. datos no publicados.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

pUST166	Derivado del pKK232-8 con la región -166 a +76 del promotor del gen <i>perA</i>	Martínez-Laguna et al. 1999.
pSR660	Plásmido para el sistema interacciones proteína-proteína basado en LexA, para homodimerización. $Tc^R$ , <i>oriV</i>	Dmitrova et al. 1998; Daines y Silver. 2000.
pM1660PerA	<i>perA</i> clonado en fase en el plásmido pRS660 como un fragmento <i>Bgl</i> II- <i>Kpn</i> I	Este trabajo.
pMA660AraC	<i>araC</i> clonado en fase en el plásmido pRS660 como un fragmento <i>Bgl</i> II- <i>Kpn</i> I	Este trabajo.
p658CAT	Derivado del plásmido pSR658 con el gen <i>cat</i> clonado en fase a <i>lexA</i> .	Daines y Silver, 2000.
p658HNS	Derivado del plásmido pSR658 con el gen <i>hns</i> clonado en fase a <i>lexA</i> .	Bustamante et al. en preparación.
pPer $\Delta$ C5	Derivado del plásmido pCST con un codón de paro en la posición.	Este trabajo.
pAITdB21	Derivado del plásmido pCST con la eliminación de los residuos 21 a 29 de PerA.	Ibarra et al. Datos no publicados.
pAITmb21	Derivado del pAITxs41 con un sitio <i>Mlu</i> I en el inicio de la región estructural y un <i>Bgl</i> III en el probable conector de la proteína	Ibarra et al. Datos no publicados
pAIAraC	Derivado del pMPM-K3 con el gen <i>araC</i> clonado en los sitios <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III	Ibarra et al. Datos no publicados

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**Tabla 3.** Oligonucleótidos usados en este estudio.

Oligo	Secuencia (5'→3')	Características
T7-BHI-Fw	GGTAAATGCTTGGATCCAAAAAAG	Construcción del pMAL-T2, introduce un sitio <i>Bam</i> HI en 5' del gen <i>perA</i> .
TAFB-2862R	TTGTTCTGCAGTTCGAGTGCTC	Construcción del pMAL-T2, introduce un sitio <i>Pst</i> I en 3' del gen <i>perA</i> .
BFPT-T7-HD3-R	CTAACAAAAGCTTACTCGAGTGTTCCCTTG	Construcción del pMAL-T2, introduce un sitio <i>Hind</i> III.
PBSA56Fw	GGGACCGGAAATATATAAAAAAAAAAAG AAAAAAGATTATTTTTTTCTTGGTGCT	Región de pegado de PerA en <i>hfpA</i> , oligo usado para EMSA.
PBSA56Rv	AGCACCAAGAAAAAAAAATAATCTTTTTTT CTTTTTTTTTTATATATTTCCGTCCCC	Complementario al anterior.
PBSA1-Fw	GGGACCGGAAATATATAAAAAAAAAAAG AAAAAAGATTATTTTTT	Región de pegado de PerA en <i>hfpA</i> , oligo usado para EMSA.
PBSA1-Rv	AAAAATAATCTTTTTTTCTTTTTTTTTTA TATATTTCCGTCCCC	Complementario al anterior.
PBSA45(2)Fw	TATATAAAAAAAAAAAGAAAAAAGATTAT TTTTTTCTTGGTGCT	Región de pegado de PerA en <i>hfpA</i> , oligo usado para EMSA
PBSA45(2)Rv	AGCACCAAGAAAAAAAAATAATCTTTTTTTCT TTTTTTTTTATATA	Complementario al anterior.
PBSA35Fw	GGGACCGGAAATATATAAAAAAAAAAAG AAAAAAG	Región de pegado de PerA en <i>hfpA</i> , oligo usado para EMSA
PBSA35Rv	AAAAATAATCTTTTTTTCTTTTTTTTTTA TATAT	Complementario al anterior.
PBSA35(2)Fw	ATATATAAAAAAAAAAAGAAAAAAGATTAT TTTTTT	Región de pegado de PerA en <i>hfpA</i> , oligo usado para EMSA
PBSA35(2)Rv	AAAAATAATCTTTTTTTCTTTTTTTTTTAT ATAT	Complementario al anterior.
PBSA25Fw	GGGACCGGAAATATATAAAAAAAAAA	Región de pegado de PerA en <i>hfpA</i> , oligo usado para EMSA
PBSA25Rv	AAAAATAATCTTTTTTTCTTTTTTT	Complementario al anterior.
PBST56Fw	CAACACCTTGAAAAATATCAGTAAATTTT TAAAAAAGCATAAAAGTATTGATT	Región de pegado de PerA en <i>perA</i> , oligo usado para EMSA
PBST56Rv	AATCAATACTTTTATGCTTTTTTTTTAAAA ATTTACTGATAITTTTCAAGGTGTTG	Complementario al anterior.

PBST45Fw	CAACACCTTGAAAAATATCAGTAAATTTT TAAAAAAGCATAA	Región de pegado de PerA en <i>perA</i> , oligo usado para EMSA
PBST45Rv	AATCAATACTTTTATGCTTTTTTTTTAAAA ATTTACTGATATTTT	Complementario al anterior.
PBST35Fw	CAACACCTTGAAAAATATCAGTAAATTTT TAA	Región de pegado de PerA en <i>perA</i> , oligo usado para EMSA
PBST35Rv	AATCAATACTTTTATGCTTTTTTTTTAAAA ATTTA	Complementario al anterior.
BST35(2)Fw	AAAAATATCAGTAAATTTTCAAAAAAAA GCATAA	Región de pegado de PerA en <i>perA</i> , oligo usado para EMSA
BST35(2)Rv	TTATGCTTTTTTTTTAAAAATTTACTGATAT TTTT	Complementario al anterior.
BST35(3)Fw	GTAATTTTTTAAAAAAAAGCATAAAAGT ATTGAT	Región de pegado de PerA en <i>perA</i> , oligo usado para EMSA
BST35(3)Rv	ATCAATACTTTTATCGTTTTTTTTTAAAAATT TTC	Complementario al anterior.
5'BST40Fw	CCTTGAAAAATATCAGTAAATTTTAAAAA AAAAGCATAA	Región de pegado de PerA en <i>perA</i> , oligo usado para EMSA
5'BST40Rv	TTATGCTTTTTTTTTAAAAATTTACTGATAT TTTCAAGG	Complementario al anterior.
3'BST40Fw	GAAAAATATCAGTAAATTTTAAAAAAA AGCATAAAAGT	Región de pegado de PerA en <i>perA</i> , oligo usado para EMSA
3'BST40Rv	ACTTTTATGCTTTTTTTTTAAAAATTTACTG ATATTTTC	Complementario al anterior.
Mut1-Fw	GGGGACaaccgATATAAAAAAAAAG AAAAAAGATTATTTTTT	Mutación en una región probable de pegado de PerA en <i>hfpA</i>
Mut1-Rv	AAAAATAATCTTTTTTCTTTTTTTTTTA TATeggggtGTCCCC	Complementario al anterior
Mut2-Fw	GGGGACGGAAATATcgccccAAAAAAG AAAAAAGATTATTTTTT	Mutación en una región probable de pegado de PerA en <i>hfpA</i>
Mut2-Rv	AAAAATAATCTTTTTTCTTTTTTTTTTA TATeggggtGTCCCC	Complementario al anterior
Mut1y2-Fw	GGGGACaaccgATcgccccAAAAAAG AAAAAAGATTATTTTTT	Mutaciones en 2 sitios probables de pegado de PerA en <i>hfpA</i>
Mut1y2-Rv	AAAAATAATCTTTTTTCTTTTTTggggcg ATeggggtGTCCCC	Mutaciones en 2 sitios probables de pegado de PerA en <i>hfpA</i>
Mut3-Fw	GGGGACaaccgATcgccccAAAAAAGAAAgg CcaATTAATTTTTT	Mutaciones en 3 sitios probables de pegado de PerA en <i>hfpA</i>



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Mut3-Rv	AAAAATAATggccTTTCTTTTTTggggcg ATcggggtGTCCCC	Mutaciones en 3 sitios probables de pegado de PerA en <i>hfpA</i>
Pbsa35Mut-F	ATATATAAAAAAAAAAGAAAAAAcctTT ATTTTTT	Mutación en 3 residuos del sitio de pegado de PerA en <i>hfpA</i>
Pbsa35Mut-R	AAAAATAAgagTTTTTCTTTTTTTTTAT ATAT	Complementario al anterior
MutG-Fw	GGGGACGGAAATATATAAAAAAAAAA AAAAAAAAAGATTATTTTTT	Mutación puntual en el sitio de pegado de PerA en <i>hfpA</i>
MutG-Rv	AAAAATAATCTTTTTTTTTTTTTTTTTA TATATTTCCGTCCTCC	Complementario al anterior
2301F	TTTTTCACGTAGCGCACG	Región promotora de <i>hfpA</i> , usado en PCR para generar el fragmento 1
2341F	TCTGGCCTGAAAGGCCCG	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 2
2395F	TTTTGTTGTCTTATCCCG	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 3
2461F	AATCCTCCATGAAGCCAG	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 4
2500R	CAGCCCTCAGCCCGCGTC	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 1
2501F	GTTTACGGTTTTTGGGAG	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 5
2540R	TACTCCTGGCATTACCCC	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 2
2541F	CCGGAAGTCAAATTCATG	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 6
2594R	TTCCGTCCCCCCCAGTAC	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 3
2581F	TGGGGGGGACGGAAATA	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 7
2621F	TTATTTTTTTTCTTGGTG	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 8
2641F	TGCGTGTCTTTTTTGTTF	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 9
2660R	AAAACATAAAAAAGAC	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 4
2661F	AAGATTATTCCTGACCT	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 10
2674F	GACCTATTAATACGGGGGTT	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 11
2700R	CTTATAAAACCCCGTAT	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 5
2740R	TTTCTTATTCATGATTTT	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 6
2780R	GCACCATTCAGATTCAA	<i>Ibid</i> , usado en PCR para generar el fragmento 7

2820R	TAAACATCACACCTGCG	<i>Ibid.</i> , usado en PCR para generar el fragmento 8
2840R	AATCAGACGCAGACTG	<i>Ibid.</i> , usado en PCR para generar el fragmento 9
2860R	AGCATTCTGCGACTTATT	<i>Ibid.</i> , usado en PCR para generar el fragmento 10
BfpA2878-R	GCTCATTACTTCTGAAATAG	<i>Ibid.</i> , usado en PCR para generar el fragmento 11
BfpA-61F	ATGGTGCTTGCGCTTGCTGCC	<i>Ibid.</i> , usado en PCR para generar el fragmento 12
BfpA-261R	TTATCCGGAATTGCAGATGTC	<i>Ibid.</i> , usado en PCR para generar el fragmento 12
TAFCAT155	CGAGATAgGATCcAGCAATGAG	Región promotora de <i>perA</i> , posición -155, usado en PCR para el fragmento 1 (Fig. 13).
TAFHD3	GCTAAATTCTCCTCaaGcTTATTTTCAG	Región codificante de <i>perA</i> , sitio <i>HindIII</i>
BFPT-MluI-R	CCTTCATACGCGTTTGTTTCT	Región promotora de <i>perA</i> , usado en PCR para el fragmento 1 (Fig. 13).
BFPT-MluI-F	AGAAAACAAACGCGTATGAAGG	Región promotora de <i>perA</i> , usado en PCR para el fragmento 2 (Fig. 13).
TdB2-417R	ATTCCGACAAGATCTATGTC	Región promotora de <i>perA</i> , usado en PCR para los fragmentos 2 y 3 (Fig. 13).
PQETA FNH	GAAGGTGGTTAATGCTTACATC	Región promotora de <i>perA</i> , usado en PCR para el fragmento 3 (Fig. 13).
TdH1-S28F	TCATATCAGAATATAGTTATATT	Región promotora de <i>perA</i> , usado en PCR para el fragmento 4 (Fig. 13).
TdH2-474R	GCAACTTAATAGATCTATCATC	Región promotora de <i>perA</i> , usado en PCR para el fragmento 4 (Fig. 13).
TdB1-T50F	ACCGAATACACAATAGAATCCAAC	Región promotora de <i>perA</i> , usado en PCR para el fragmento 5 (Fig. 13).
TB2-590LNK-R	CTGAGTATTTTAGATCTGTAAT	Región promotora de <i>perA</i> , usado en PCR para el fragmento 5 (Fig. 13).
TdB2-451F	GATGATAGATCTAATTAAGTTGC	Región promotora de <i>perA</i> , usado en PCR para el fragmento 6 (Fig. 13).
TdH4R	CATTAAGTAGATCTTTATAATC	Región promotora de <i>perA</i> , usado en PCR para el fragmento 6 (Fig. 13).

T-B2-190F	GTTAATGCTTagatctAAAAAAG	Construcción de la fusión LexA-PerA, inserta un sitio <i>BglII</i>
T-Kpl-R	AAGATTTTAGGTACCTCTAACAAAAAC	<i>Ibid.</i> , inserta un sitio <i>KpnI</i>
AraB	AAGTATGGCTAGATCTCAAAATGATCC	Construcción de la fusión LexA-AraC, inserta un sitio <i>BglII</i> .
AraK	TGTCTGATTCCGGTACCATTATGA	<i>Ibid.</i> , inserta un sitio <i>KpnI</i>
Favor	GGGTTTTCCCAGTCACGACG	Oligo universal de plasmidos derivados de pUC18/19
Contra	CGGATAACAATTTACACAG	<i>Ibid.</i>
GRE/gIRE-S	TCGAGCTCTCTTCTGTTCTGCTTGACTTCC TAGG	Oligonucleótido inespecífico (Pedraza-Alva et al. 1996).
GRE/gIRE-NS	CCTAGGAAGTCAAGCAGAACAGAAGAGAG CTCGA	<i>Ibid.</i>
STAT6-5'	GATCAGTCCTTGAATGGTGTGAAGTAAAAG TGCCTTCAAAGAATCCC	Olivares et al. En preparación
STAT6-3'	GGGATTCTTTGAAGGCACCTTTTACTTCACA CCATTCAAGGACTGATC	Oligo complementario
SDH-802	GTTGCCGCTGGTAGGTCGTG	Usado en la secuenciación de los vectores de homodimerización (Dimitrova et al. 1998)
SDH-913	GGTGCGCCTAGGTCGTGTGG	Usado en la secuenciación de los vectores de heterodimerización (Dimitrova et al. 1998)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VI. RESULTADOS

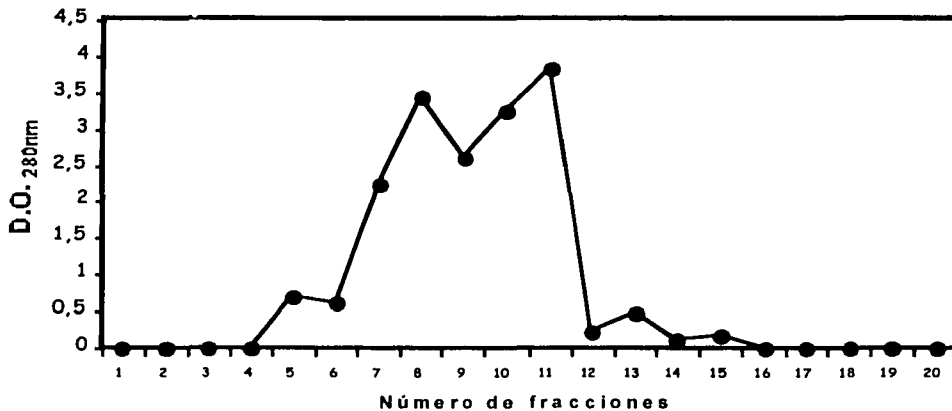
### Purificación de PerA

En este trabajo se purificó la proteína PerA fusionada a la proteína unidora de maltosa (MBP o MalE), estrategia que ha sido usada eficientemente para purificar a otros miembros de la familia de proteínas a la que pertenece PerA, tales como Rns, VirF, ExsA, GadX, HilC y HilD (Hovey y Frank, 1995; Munson y Scott, 1999; Shin et al. 2001; Tramonti et al. 2002). Para este fin, se utilizó el plásmido pMAL-T2, el cual se construyó clonando en fase el gen *perA* a la región que codifica para el carboxilo terminal de la proteína MBP del plásmido pMalC2xa.

La expresión de la proteína de fusión se realizó en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLys7/pMAL-T2, mediante inducción con IPTG. El extracto obtenido se pasó por una columna de afinidad de amilosa y se colectaron fracciones a las cuales se les determinó la absorbancia a 280 nm (Fig. 8). Al correr las fracciones colectadas en un gel de poliacrilamida, se observaron dos productos: uno del peso esperado para la fusión MBP-PerA, *ca.* 71 kDa, y otro, en cantidad similar al primero, pero con un peso menor al de la fusión y mayor al de MBP (*ca.* 55 kDa) (Fig. 9A). Una inmunodetección por “western blot” con anticuerpos anti-MBP reveló que dicho subproducto (designado como MBP-PerA<sup>NH</sup>) corresponde a una versión incompleta de la proteína de fusión MBP-PerA, probablemente generada por degradación, o bien, por procesamiento de tipo post-transcripcional o post-traducciona (Fig. 9C). La integridad de la fusión MBP-PerA en el producto de mayor peso, se confirmó mediante un experimento tipo “western blot” con un anticuerpo generado contra un péptido constituido por los últimos 15 aminoácidos de PerA (el título del anticuerpo fue de 1:5,000 por ELISA en ambos conejos) (Fig. 9B). La funcionalidad de MBP-PerA se demostró por su capacidad de complementar la expresión de la proteína BfpA y el fenotipo de adherencia localizada

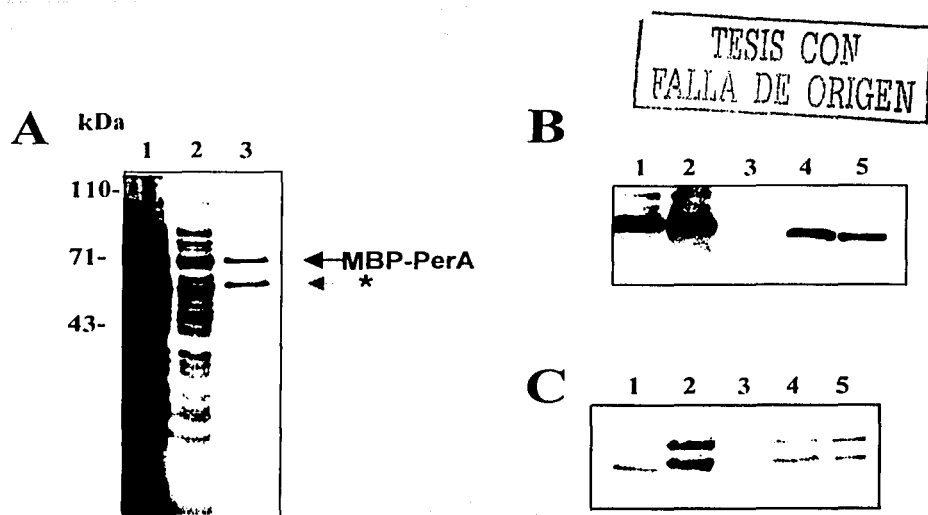
sobre células HeLa en la cepa EPEC E2348/69 *perA::km/pMAL-T2* y B171 *hfpT::Gm*  
(Fig. 10 y datos no mostrados).

## Purificación de MBP-PerA



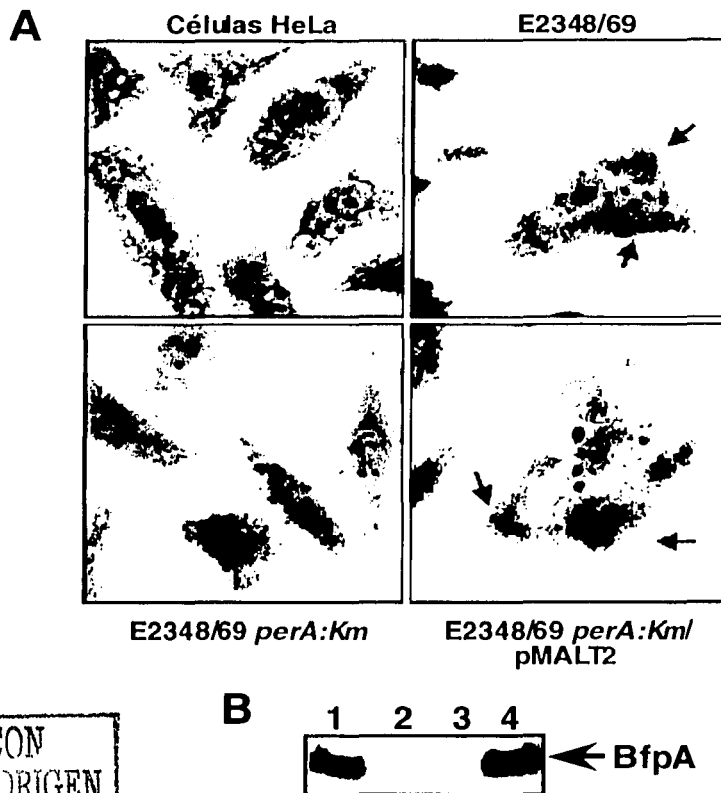
**Figura 8.** Purificación de MBP-PerA. En la gráfica se muestra la  $DO_{280}$  de las fracciones colectadas de la columna de amilosa después de la elución con regulador de columna con maltosa 10 mM (ver materiales y métodos). Las fracciones dentro del pico de mayor densidad se juntaron y se les determinó la concentración de proteínas por la técnica de Bradford.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 9.** Purificación de MBP-PerA. En el panel A se muestran un lisado de bacterias inducidas con IPTG 0.3 mM (1), el extracto crudo obtenido por ultrasonificación (2) y la proteína purificada por columna de amilosa (3), en un gel de SDS-PAGE al 10% teñido por Coomassie. El asterisco señala al subproducto MBP-PerA<sup>NI</sup>. (B) Inmunodetección con anticuerpos dirigidos contra los últimos 15 aminoácidos de PerA. BSA (1), conjugado BSA-PerACOOH usado en la inmunización de los conejos (2), bacterias con el plásmido pMALT2 sin inducción (3), extracto crudo de bacterias después de la inducción (4), proteína purificada (5). (C) Inmunodetección con anti-MBP de la proteína purificada. Carriles: control de MBP (1), cultivos inducidos con IPTG (2 y 4), células sin inducir (3), proteína purificada (5).

El producto purificado se digirió con el factor Xa (New England) para separar PerA de MBP. Se realizó una cinética a temperatura ambiente y los productos se observaron en un gel de poliacrilamida al 12% (datos no mostrados). La eficiencia de recuperación de PerA fue muy baja, por lo que tomando en consideración que mantenía su función como activador al complementar una mutante en *perA* (ver más adelante y Fig. 10), se decidió trabajar con la fusión completa.



**Figura 10.** Complementación de una mutante *perA::km* con MBP-PerA. La adherencia localizada se realizó con monocapas de células HeLa, las cuales se infectaron o no con las cepas que se indican. Las microcolonias se señalan con flechas negras. (B) Inmunodetección de BfpA en las cepas EPEC E2348/69 (silvestre) (1), JPN15 (2), E2348/69 *perA::km* (3) y E2348/69 *perA::km/pMALT2* (4).

Como se mencionó, el subproducto MBP-PerA<sup>NII</sup>, corresponde a MBP y a aproximadamente los primeros 50 aminoácidos de PerA de acuerdo al peso molecular (Fig. 9A). Su generación podría deberse a la acción de proteasas que actúan sobre PerA para mantener controlados sus niveles en la bacteria. Este es el caso de un procesamiento que se conoce como la “regla del extremo amino”, en la cual la presencia

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

abundante de residuos de lisina y arginina en el extremo amino terminal favorecen la acción de la proteasa ClpA (Tobias et al. 1992.). Con estos antecedentes se decidió determinar si es que PerA está sujeto a este tipo de regulación post-traducciona, por lo que se probó la expresión de la fusión MBP-PerA en una mutante *clpPX* (que forman parte de la proteasa ClpA). En esta cepa, al igual que en MC4100, la cepa mutante en la proteasa *lon* y EPEC E2348/69, se siguió observando el producto MBP-PerA<sup>NII</sup> (datos no mostrados), indicando que PerA no está sujeto a este proceso proteolítico. No se descarta la posibilidad de que el procesamiento post-transcripcional o que otra proteasa sea la que actúa post-traduccionalmente.

#### **Interacción de PerA con el DNA.**

**Ensayos de retardamiento de banda.** A partir del análisis de fusiones transcripcionales conteniendo recortes de las regiones reguladoras de *bfpA* y *perA*, se propuso que las secuencias contenidas entre las posiciones -85 a -46 de *bfpA* y -81 a -42 de *perA*, las cuales comparten 73% de identidad y son indispensables para la activación dependiente de PerA en ambos genes, podrían constituir el sitio de unión de esta proteína (Fig. 7; Bustamante et al. 1998, Martínez-Laguna et al. 1999). Para comprobar lo anterior, se realizó un ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés) con un producto de PCR de 200 pb que comprendía la secuencia localizada entre las posiciones -214 a -15 de la región reguladora de *bfpA* y la proteína purificada. Se probaron concentraciones crecientes de MBP-PerA con el DNA y se incubaron en regulador de unión por 20 minutos a temperatura ambiente. Al término, se corrieron las mezclas en agarosa al 2.0% en TBE 0.5X a 120 V de corriente. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió (Fig. 11A). Lo mismo se hizo para la región promotora de *perA* con un fragmento que comprende las posiciones -155 a

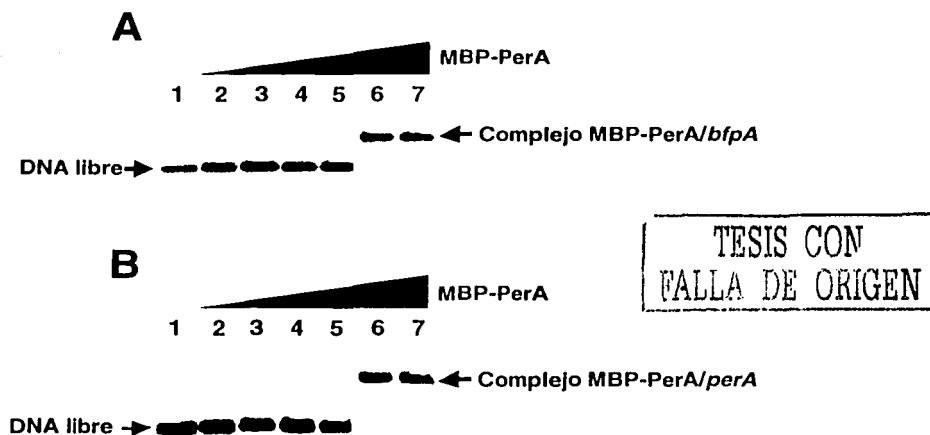


+21 (Fig. 11B). Con esta estrategia se observó un retardo progresivo de ambos fragmentos observándose el retardo de la sonda a una concentración de 2.16 ó 4.3  $\mu\text{g}$  de proteína (1.5 y 3  $\mu\text{M}$ ). Por lo tanto, en estas dos regiones está contenido el sitio de unión de PerA para ambos genes.

Con el fin de delimitar con mayor certeza el sitio de unión de PerA en *bfpA*, se realizaron ensayos tipo EMSA con 2.16  $\mu\text{g}$  de MBP-PerA y fragmentos de DNA de 200 pb que abarcan la región comprendida entre las posiciones -374 a +280 de *bfpA* y que sobrelapan de manera sucesiva en 160 pb (Fig. 12). Los resultados indicaron que PerA interactúa únicamente con fragmentos que contienen secuencias corriente abajo de la posición -85.

Sin embargo, al rebasar esta región hacia el extremo 3', aún se seguía observando, aunque no con la misma afinidad de forma cualitativa, un retardo de fragmentos que contenían las posiciones -34 a +166. Esto sugirió que PerA se unía también a una región río abajo del promotor, en la región estructural de *bfpA*. La propiedad de unirse a sitios adicionales en el gen estructural no es exclusiva de PerA, ya que ha sido también documentada para otros miembros de la familia AraC/XyIS que están involucrados en la regulación de genes de virulencia (Munson y Scott, 2000; Munson et al. 2001).

Al realizar el mismo experimento con fragmentos que contenían la región reguladora de *perA*, se encontró que el fragmento de DNA que comprendía la región de unión propuesta era retardado. Al igual que en *bfpA*, el retardo de fragmentos dentro de la región codificante, sugirió la existencia de un segundo sitio de unión en la región +180 a +426 (Fig. 13).

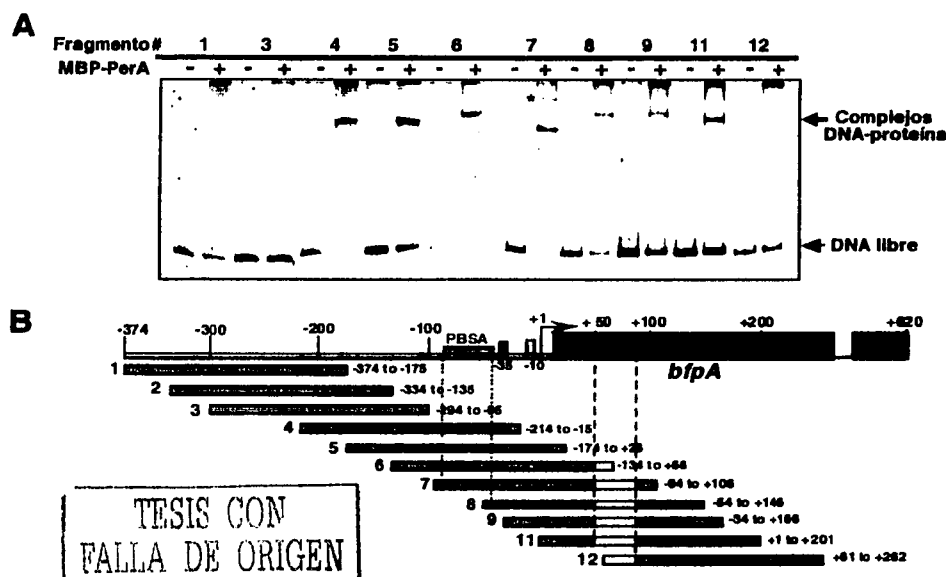


**Figura 11.** EMSA de las regiones reguladoras de *hfpA* (A) y *perA* (B). Se usaron las siguientes concentraciones de MBP-PerA: 0 (1), 0.11 (2), 0.21 (3), 0.43 (4), 0.87 (5), 2.16 (6) y 4.3  $\mu\text{g}$  (7) (0, 74nM, 148nM, 298nM, 596nM, 1.5 $\mu\text{M}$  and 3 $\mu\text{M}$ , respectivamente). Los complejos proteina-DNA se indican en el costado derecho de la foto en cada caso. Los gels de agarosa al 2.5% se tiñeron con bromuro de etidio.

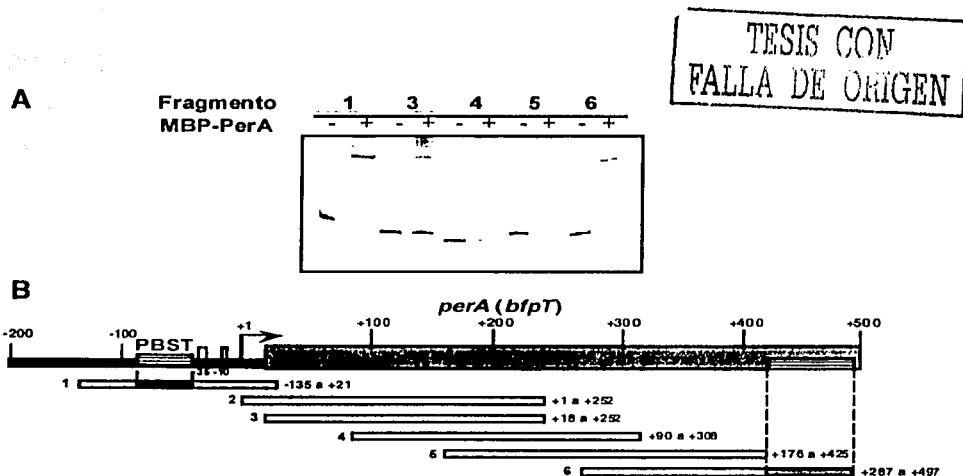
### Ensayos de protección a DNasa I.

Ensayos de protección a DNasa I (“footprinting”) de la región reguladora de *hfpA* con la proteína MBP-PerA mostraron que PerA interactúa con secuencias localizadas en la región -84 a -46 de *hfpA* (Fig. 14A). Como se señaló anteriormente, dicha región es requerida en su totalidad para la expresión óptima de una fusión transcripcional *hfpA-cat* (Bustamante et al. 1998).

En el caso de *perA*, la región de protección abarca las posiciones  $-81$  a  $-42$ , que incluye 17 pb adicionales río-arriba del sitio de unión propuesto previamente con base en la identidad existente entre las regiones promotoras de ambos genes (posiciones  $-65$  a  $-32$ , Fig. 14B) (Bustamante et al. 1998). Sin embargo, este resultado es consistente con lo determinado por Martínez-Laguna et al. (1999), quienes encontraron que la región de DNA hasta la posición  $-81$  es necesaria para la óptima expresión de una fusión transcripcional *perA-cat*.



**Figura 12.** Retardo de fragmentos de PCR de 200 pb correspondientes a la región reguladora y estructural del gen *bfpA* con  $2.16 \mu\text{g}$  ( $1.5 \mu\text{M}$ ) (+) y sin (-) la proteína MBP-PerA (panel A). El asterisco (\*) en el fragmento 7 indica la presencia de un segundo complejo proteína-DNA de menor movilidad electroforética. (B) Esquema de los fragmentos usados en el retardo del panel A representados por rectángulos naranjas con las coordenadas que contienen del lado izquierdo. Las probables regiones de pegado de la proteína (PBSA) se marcan con un rectángulo sobre el esquema del gen y dentro de las barras que representan a los fragmentos usados; en azul se representa el PBSA1 y en amarillo el PBSA2.



**Figura 13.** Retardo de fragmentos de PCR correspondientes a la región reguladora y estructural del gen *perA*. (A) Se usó una concentración constante de 2.16  $\mu\text{g}$  (1.5  $\mu\text{M}$ ) de MBP-PerA en los carriles donde se indica (+). En el panel B se indica la región que comprende cada uno de los fragmentos con las coordenadas que contienen del lado derecho. Las probables regiones de pegado de la proteína (PBST) se marcan con un rectángulo negro sobre el esquema del gen y dentro de las barras que representan a los fragmentos usados. PBST, sitio de unión de PerA en *perA* (*bfpT*).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

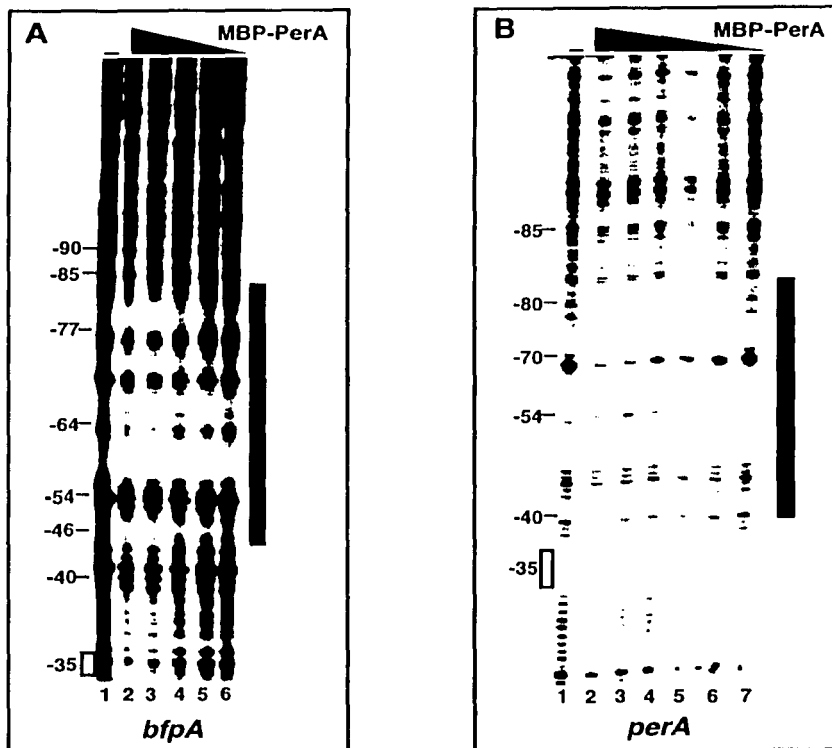
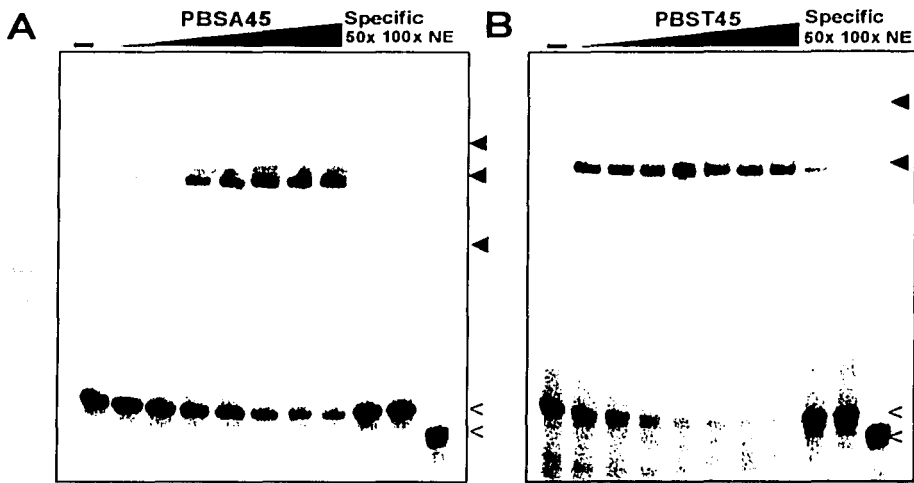


Figura 14. Ensayo de protección a DNasa I de las regiones promotoras de *hfpA* (A) y *perA* (B). Las concentraciones de MBP-PerA usadas fueron: 0 nM (1), 2.2 $\mu$ M (2), 1.26 $\mu$ M (3), 634nM (4), 316nM (5) y 159 nM (6) en el panel A; y 0 nM (1), 1.5 $\mu$ M (2), 753nM (3), 295nM (4), 148nM (5), 74nM (6) y 37nM (7) en el panel B. Las cajas negras indican regiones de protección.

### Caracterización del primer sitio de unión en *bfpA*.

Con el propósito de confirmar las observaciones anteriores y de determinar la secuencia mínima requerida para el pegado de la proteína en los promotores estudiados, se realizaron ensayos de EMSA con oligonucleótidos de doble cadena (oligos) de diversos tamaños que incluían total o parcialmente las secuencias identificadas como el sitio de pegado de la proteína, siguiendo el método descrito por Carey (1988) y Santana et al. (2000). En estos experimentos, concentraciones crecientes de PerA (75 nM, 159 nM, 316nM, 634nM, 1.26 $\mu$ M y 2.2 $\mu$ M) se pusieron a interactuar con oligos marcados con [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -dATP como se describe en la sección de materiales y métodos.

Para *bfpA* se inició con un oligo de 45 pb (PBSA45) que abarcaba las posiciones -90 a -46, observándose la formación de un complejo principal de proteína-DNA, mientras que la proteína no interaccionó con un oligo inespecífico de 34 pb de origen eucariote (Fig. 15A). Así mismo, la formación del complejo se redujo significativamente cuando la unión se compitió con un exceso del mismo PBSA45 sin marcar. El retardo del oligo PBSA45 fue dependiente de la concentración de proteína al compararlo por densitometría con la cantidad de oligo sin proteína, alcanzando aproximadamente un 100% de retardo con 2.2  $\mu$ M. El mismo resultado se obtuvo cuando se usó un oligo de 56 pb (PBSA56) que extendía el PBSA45 hasta la posición -31 (tabla 4). Estos resultados son consistentes con los ensayos de protección a DNasa I y demuestran que el sitio de unión de PerA está en los 45 pb del PBSA45.



**Figura 15.** EMSA de oligonucleótidos de 45 pb de la región de pegado de PerA en *bfpA* y *perA*. En ambos casos se usaron las concentraciones 0, 26.4 nM, 132.05 nM, 237.6 nM, 475.4 nM, 950.8 nM, 1.85  $\mu$ M y 2.64  $\mu$ M de MBP-PerA; con el oligo NE se usó la mayor concentración usada. A) Oligo PBSA45 que comprende los residuos -90 a -46 del gen *bfpA*. B) Oligo PBST45 con los residuos -81 a -39 del gen *perA*. La unión, en cada caso, es específica ya que la formación de complejos se ve disminuida al competir con el mismo oligo no marcado en exceso molar. En ambos casos, un oligonucleótido inespecífico de 37 pb no es retardado. N.E. oligonucleótido no específico.

Al hacer un recorte de 10 pb de la región 3' del PBSA45, dejando hasta la posición -55 (oligo PBSA35, Tabla 4 y Figura 16A), la interacción se redujo al 19%, comparada con la observada para el PBSA45. Al recortar otros 10 pb, hasta -64, no hubo retardo (oligo PBSA25). Se realizaron otros recortes y los resultados de los experimentos se muestran en la tabla 4.

En un intento por definir la existencia de dos posibles sitios de unión dentro de los 45 pb, se probaron 2 oligos de 25 pb que contenían, cada uno, la mitad del sitio de pegado de PerA. La falta de reconocimiento de estos oligos, PBSA1/2 (-90 a -66) y PBSA2/2 (-65

a -39). indicó que el sitio de pegado de PerA requiere de la continuidad e integridad de esta secuencia (Tabla 4). Lo anterior se confirmó al observar que un oligo de 45 pb (2/2ext), que contenía la secuencia del PBSA2/2 más 5 pb inespecíficas en el extremo 5' y 13 pb específicas en el extremo 3', no era retardado (dato no mostrado). Otra posibilidad es que el sitio de pegado se encuentre centrado en dicha secuencia dentro de los 45 pb.

Por otro lado, la eliminación de bases del extremo 5' con respecto del PBSA45 y PBSA56 en el oligo PBSA39 no afectó la interacción de PerA; mientras que la eliminación hasta la posición -78 afectó la interacción de PerA en un 53% (oligo PBSA35-2) (Fig. 16A).

En su conjunto, estos datos indicaron que la secuencia mínima necesaria para la unión eficiente de PerA está contenida entre las posiciones -84 a -45. Para determinar la importancia de determinados residuos dentro de la secuencia de DNA del sitio de pegado, se utilizaron oligos que contenían cambios puntuales o en trechos de 5 ó 6 bases. Así, la mutación G64A (oligo PBSAmG64, Tabla 4 y Fig. 16A) no afectó la afinidad de la proteína. Esto a pesar de que dicho residuo se observa marcadamente protegido en los experimentos de protección a DNasa I (Fig. 14A). Por otro lado, la introducción de mutaciones en trechos de 6 pb en diferentes puntos de la secuencia afectaron en diferente grado la interacción con PerA. De esta manera, la alteración independiente de dos regiones cerca del extremo 5' del oligo redujo la unión de la proteína en 30% y 28% para las posiciones -84 a -79 (Mut-1) y -76 a -71 (Mut-2), respectivamente (Fig. 16A). Esto sugiere que la secuencia alrededor de las posiciones -76 a -71 es relativamente importante para la adecuada unión de PerA y que, coincidente con lo observado con los oligos PBSA39 y PBSA35-2, el extremo 5' de la región de pegado juega un papel menos



fundamental en la unión de PerA. Cuando se mutaron simultáneamente las dos regiones antes mencionadas (oligo Mut1-2), la interacción disminuyó en un 79%, por lo que es probable que la proteína requiera de ambas regiones para su unión. Al generar otra mutación de 5 pb en el extremo 3' en la región -60 a -56 (Mut3) (Fig. 16A), donde se observó una protección a la DNasa I, también se redujo el pegado en 57% (Tabla 4). Al introducir las tres mutaciones simultáneamente (Mut1-2-3), se abolió completamente el pegado (Fig. 16A). En su conjunto, estos resultados sugieren que PerA interactúa con motivos particulares dentro de la región -90 a -46. Sin embargo, resulta interesante que incluso cambios de 4 a 6 pb tengan efectos variados, sugiriendo que PerA posee cierta flexibilidad para interactuar con mayor o menor afinidad con regiones que presentan variaciones alrededor de una secuencia básica. Por otro lado, al mutar 6 pb vecinos al sitio de pegado en 5' (5'Mut, -90 a -85), sólo se vio afectado el pegado en 25 % (Tabla 4); así mismo, una mutante puntual en la posición G84 (PBSAmG84) no tuvo ningún efecto en el pegado (Tabla4). Esto sugiere que se puede delimitar la región de pegado de PerA en *hfpA* de las posiciones -85 a -46, y que la secuencia vecina podría dar estabilidad al pegado de la proteína. Cabe señalar que es necesario evaluar el efecto de estos cambios en la expresión de *hfpA* mediante el uso de fusiones transcripcionales, ya que no se puede descartar la posibilidad de que el efecto moderado de algunas mutaciones en la interacción de PerA con el DNA en los ensayos tipo EMSA, tenga un efecto más drástico en la expresión de *hfpA*.

#### **Caracterización del primer sitio de unión en *perA*.**

Se siguió la misma estrategia experimental descrita anteriormente para la caracterización del primer sitio de unión en el promotor de *hfpA*. Así, se determinó que

PerA reconoce eficientemente oligos de 45 pb (PBST45) y 56 pb (PBST56) que abarcan las regiones localizadas entre las posiciones -84 a -40 y -84 a -29, respectivamente (Fig. 16B y Tabla 5).

Cuando se tomó como base el oligo PBST45 y se recortaron 10 pb del extremo 5' (PBST35-2) la unión cayó en 50 %, lo que indica que estas bases son importantes para el pegado. Por su parte, un recorte de 10 pb del extremo 3' (PBST35) generó un efecto más dramático, al reducir la unión en 92% (Tabla 5, Fig. 16B). Esto coincide con lo observado para *hfpA*, donde eliminaciones en el extremo 5' de la región de pegado no son tan relevantes como aquellas en el extremo 3'.

Cuando se tomó como base el PBST56, y se le recortaron 21 pb del extremo 5' (oligo PBST35-3), de las posiciones -64 a -30, no se detectó interacción alguna (Tabla 5, Fig. 16B). Esto es muy similar a lo observado para el sitio de pegado de PerA en *hfpA*, en el sentido de que la proteína no es capaz de interactuar con la mitad del sitio de pegado y apoya la idea de que se requiere de una secuencia de al menos 40 pb para obtener un buen pegado de la proteína. Interesantemente, los oligos de 40 pb que comprendían las regiones -79 a -40 (PBST40-1) y -75 a -36 (PBST40-2) fueron retardados tan eficientemente como los de 45 y 56 (Tabla 5 y Fig. 16B). Esto permitió definir con mayor certeza que los 40 pb incluidos en la región -75 a -36 incluyen el sitio de pegado de PerA en su propio promotor (Tabla 5). Adicionalmente, los datos con los oligos PBST40-2 y PBST35-2 remarcaban la importancia para el pegado del activador del residuo G-75 y de la secuencia  $5'AAGT_3'$ , en el extremo 3' de la región. Más adelante se discute como podrían integrarse estos datos, junto con los obtenidos para *hfpA*, con el fin de encontrar una secuencia consenso para el pegado de PerA.

Con base en los datos observados por EMSA para los oligonucleótidos de *bfpA* y *perA* con diferentes concentraciones de proteína, se procedió a determinar la constante de disociación aparente ( $K_d$ ) para ambos casos, de acuerdo a lo descrito en Sambrook y Russell (2000), Carey (1988, 1991) y por Lane et al. (1992). Brevemente, en los EMSA de los oligos de 56 pb (PBSA56 y PBST56) se determinó por densitometría la cantidad de DNA libre para cada concentración de proteína y se normalizó contra el DNA libre sin proteína. Estos datos se graficaron contra el logaritmo de la concentración de proteína. La  $K_d$  aparente se describe como la concentración de proteína en la cual se observa la mitad del DNA retardado (Carey, 1988). Así, la  $K_d$  para *bfpA* fue de  $5.5 \times 10^{-7}$  M (0.55  $\mu$ M) y para *perA* de  $3.5 \times 10^{-7}$  M (0.35  $\mu$ M), por lo que PerA pareciera ser más afin a su propio promotor, aunque la diferencia entre ambos datos no es significativa.

#### **Caracterización del segundo sitio de pegado en *bfpA*.**

Con el fin de iniciar el estudio del segundo sitio de interacción de PerA en *bfpA*, se realizaron experimentos de protección a DNasa I con un fragmento que contenía la región -15 a +166. Dichos experimentos revelaron que PerA protege la región localizada entre las posiciones +43 a +106 (Fig. 17A). Para confirmar este resultado se sintetizó un oligonucleótido de 56 pb que comprendía las posiciones +45 a +101 y se realizó un EMSA. Este resultó en el retardo del DNA, aunque con una menor afinidad (aproximadamente del 50% por densitometría) que la observada con un oligonucleótido del mismo tamaño pero correspondiente al primer sitio de unión (Fig. 17B y Tabla 4).

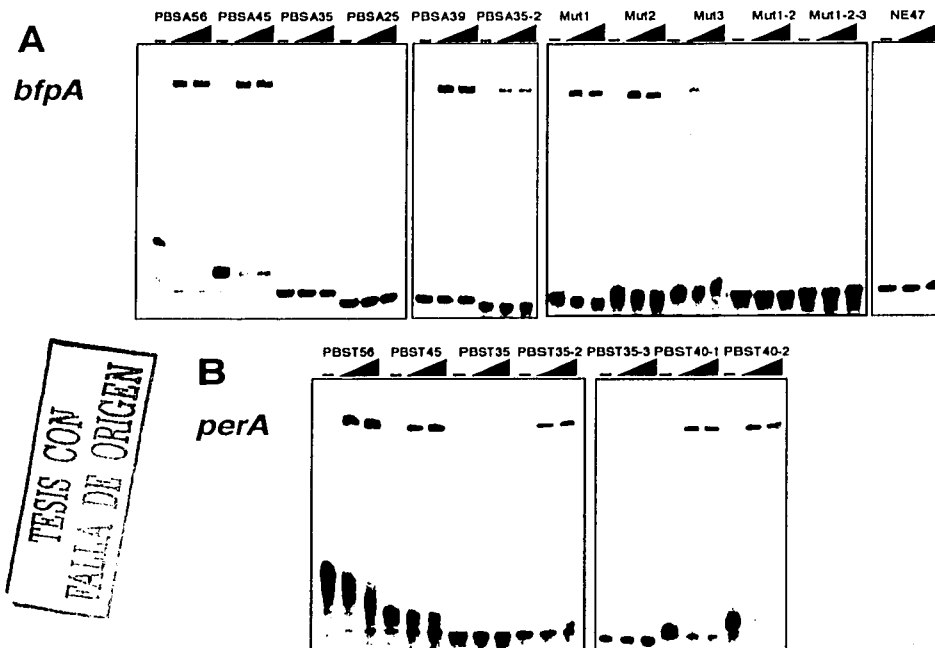


Figura 16. EMSA de oligonucleótidos con recortes que se describen sobre la secuencia del promotor de *bfpA* en la tabla 4 y 5. En cada gel se corrió de forma paralela el oligo PBSA45 (A) y PBST45 (B) como control y con fines comparativos. Las concentraciones de MBP-PerA utilizadas fueron de 1.06 y 2.1  $\mu$ M. Con base en estos geles se determinó por densitometría el grado de retardo para cada oligo y se comparó con el del PBSA45 (Tabla 4) o con el PBST45 (Tabla 5). N.E. no específico.

Por otro lado, se probó una fusión transcripcional *bfpA-cat* con un recorte a la posición +27 (pCAT+27) y se comparó con la fusión usada en éste y otros estudios que comprende hasta la posición +76 (Puente et al. 1996; Bustamante et al. 1998). Como se puede ver en la figura 18, la fusión con el recorte a +27 fue más activa; además, mostró una ligera actividad independiente de PerA en un fondo carente del plásmido EAI y, por lo tanto, del gen *perA*. Lo anterior sugiere que la secuencia que comprende el segundo sitio de

pegado de PerA podría ser el sitio de unión de un modulador negativo para la expresión de *hfpA*. Este modulador podría ser un regulador global, ya que este mismo resultado se obtuvo en una cepa de *E. coli* MC4100 (datos no mostrados). Aunque no se puede descartar la posibilidad de que PerA sea capaz de modular la expresión de *hfpA* en determinadas condiciones de crecimiento.

Sonda	Región promotora de <i>hfpA</i> *								Retardo relativo (%) <sup>b</sup>						
	-98	-90	-85	-77	-64	-54	-46	-40		-35					
PBSA5 6	GTACT	GGGG	CGA	AAAT	TATA	AAAA	AAAA	AAAA	AGATT	TTTT	TTTT	TTTC	TTGGT	GCT	100
PBSA4 5	GGG	GAC	CGA	AAAT	TATA	AAAA	AAAA	AAAA	AGATT	TTTT	TTTT				100
PBSA3 5	GGG	GAC	CGA	AAAT	TATA	AAAA	AAAA	AAAA	AG						19
PBSA2 5	GGGA	CGA	AAAT	TATA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA							<1
PBSA2 /2									AGAAAA	AGATT	TTTT	TTTT	CTGG		0
PBSA3 9		GG	AAAT	TATA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AGATT	TTTT	TTTT				100
PBSA3 5-2				ATATA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AGATT	TTTT	TTTT				47
Mut1	GGGA	CA	CC	CGAT	TATA	AAAA	AAAA	AAAA	AGATT	TTTT	TTTT				70
Mut2	GGG	GAC	CGA	AAAT	TG	CCCC	AAAA	AAAA	AGATT	TTTT	TTTT				82
Mut3	GGGA	CGA	AAAT	TATA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	GGCCA	ATTAT	TTTT				43
Mut1-2	GGGA	CA	CC	CGAT	CG	CCCC	AAAA	AAAA	AGATT	TTTT	TTTT				21
Mut1-2-3	GGGA	CA	CC	CGAT	CG	CCCC	AAAA	AAAA	AAAA	GGCCA	ATTAT	TTTT			<1
5' MUT	TCTTC	TGG	AAAT	TATA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AGATT	TTTT	TTTT				75
PBSAm G64	GGGA	CGA	AAAT	TATA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AGATT	TTTT	TTTT				100
PBSAm G84	GGGA	CA	GAAA	TATA	AAAA	AAAA	AAAA	AAAA	AGATT	TTTT	TTTT				100
PBSA2 -56 <sup>c</sup>	TTAT	GGTT	CTAAA	ATCAT	GAATA	AGAAA	TACGA	AAAAG	GTCTG	TCITT	GATTGAA				53 <sup>d</sup>
NE34 <sup>e</sup>	TGGAG	CTCTCT	TCTGT	TCTGC	TTGAC	TTCC	TAGG								<1 <sup>d</sup>
NE47 <sup>e</sup>	GATCAG	TCCTT	GAATG	GTGTG	AAGTA	AAAGT	GCCTT	CAAAG	ARTCC						4 <sup>d</sup>

a. Las secuencias modificadas están subrayadas. La caja gris indica la localización de la secuencia mínima propuesta para la unión de PerA.

b. Estimado por densitometría de los EMSA en comparación con la sonda PBSA45.

c. La secuencia corresponde a las posiciones +38 a +93 de *hfpA*.

d. Relativo a PBSA56.

e. Secuencias inespecíficas.

Tabla 4. Retardo relativo de oligonucleótidos de la región reguladora de *hfpA*. El porcentaje de retardo se obtuvo por densitometría y se comparó con el retardo del oligo PBSA45, el cual se consideró como el 100%.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Región promotora de <i>perA</i> <sup>a</sup>							Retardo relativo (%) <sup>b</sup>
Sonda	-81	-75	-66	-54	-40	-35	
	CAACACCTTGAAAAATATCAGTAAATTTTAAAAAAAAGCATAAAGTATTGATTTTACAGAG						
PBST56	CAACACCTTGAAAAATATCAGTAAATTTTAAAAAAAAGCATAAAGTATTGAT T						100
PBST45	CAACACC TTGAAAATAATCAGTAAATTTTAAAAAAAAGCATAA						100
PBST35	CAACACC TTGAAAAATAATCAGTAAATTTTAAAAA						8
PBST4 0-1	CCTTGAAAAATATCAGTAAATTTTAAAAAAAAGCATAA						100
PBST3 5-2	AAAAATATCAGTAAATTTTAAAAAAAAGCATAA						50
PBST4 0-2	GAATAATATCAGTAAATTTTAAAAAAAAGCATAAAGT						100
PBST3 5-3	GTAAATTTTAAAAAAAAGCATAAAGTATTGAT						0

<sup>a</sup>. La caja gris indica la localización de la secuencia mínima propuesta para la unión de PerA.

<sup>b</sup>. Estimado por densitometría del EMSA de cada sonda en comparación con la sonda PBST45.

Tabla 5. Retardo relativo de oligonucleótidos de la región reguladora de *perA*. El porcentaje de retardo se obtuvo por densitometría y se comparó con el retardo del oligo PBST45 el cual se consideró como el 100%.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Interacción proteína-proteína en PerA.

Munson y Scott (1999) mostraron que Rns, un activador que pertenece a la misma subfamilia que PerA y que regula la expresión de un pilus en *E. coli* enterotoxigénica, se une a una secuencia mínima de aproximadamente 40 pb. En esta región, Rns hace contactos sólo con residuos de dos surcos mayores vecinos en forma asimétrica, sugiriendo que interactúa en forma monomérica. Los resultados descritos anteriormente sugieren que PerA también se une a su sitio de pegado como un monómero y que los contactos más estrechos se localizan hacia el centro de la secuencia de 40 pb.

Para analizar lo anteriormente propuesto, se usó un sistema que permite evaluar interacciones proteína-proteína basado en LexA. En este, se fusiona la proteína a investigar con los primeros 87 aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína LexA, que es donde está el dominio de unión a DNA. La quimera se introduce a una cepa que contiene

una fusión transcripcional *sulA-lacZ*, la cual tiene operadores para LexA. Si una proteína dimeriza, la quimera de LexA podrá formar dímeros e inhibir la transcripción de *sulA-lacZ*; por el contrario, si no hay interacción, los niveles de la enzima  $\beta$ -galactosidasa se mantendrán elevados (Fig. 19) (Dmitrova et al. 1998; Daines y Silver, 2000). En el presente estudio, se construyó la fusión *lexA-perA*, la cual demostró ser funcional al complementar una cepa EPEC mutante *perA::km* (Fig. 20), además de que se verificó su secuencia.

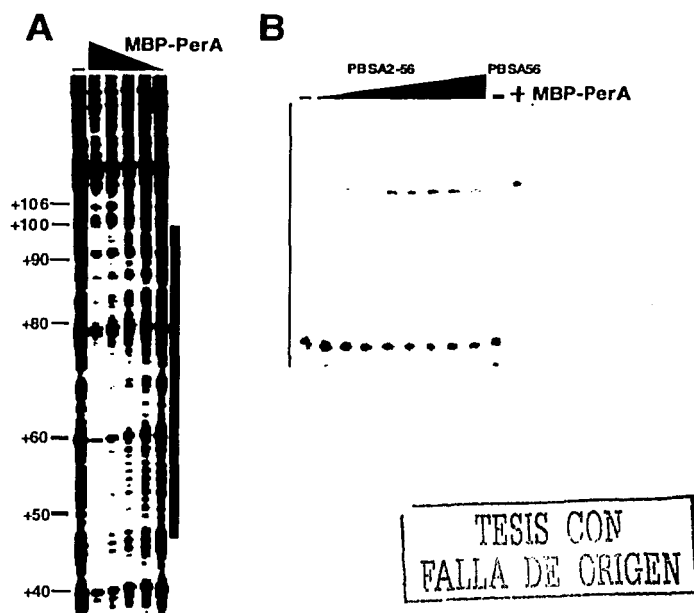
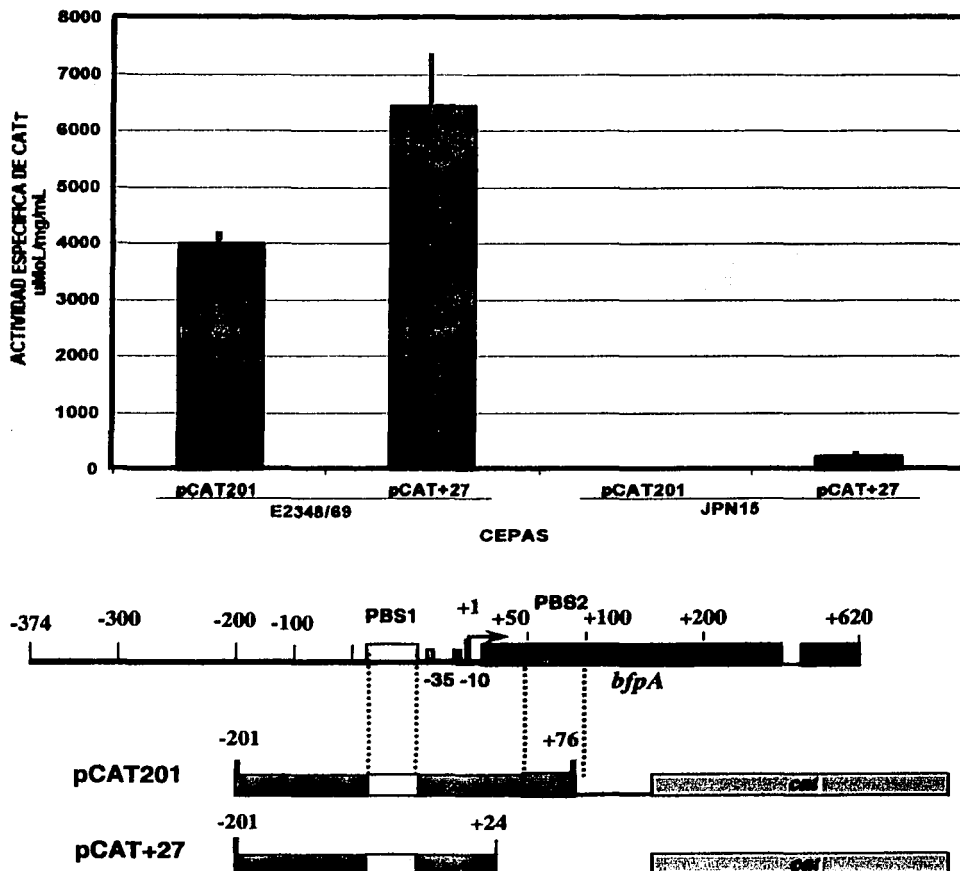


Figura 17. Protección a la acción de la DNasa I del segundo sitio de pegado de PerA en *hfpA* (A) y EMSA de un oligo de 56 pb retardado con la proteína MBP-PerA (B). Los triángulos negros indican concentraciones crecientes de la proteína que fueron similares a las usadas en las protecciones de la figura 14. En el EMSA se usaron las mismas concentraciones que para la figura 15, más un carril con  $5.04 \mu\text{M}$ . En el mismo gel se corrió el oligo PBSA56 con y sin  $20 \mu\text{g}$  de MBP-PerA para comparar la afinidad. La secuencia de ambos oligos se observa en la tabla 4.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 18.** Actividad de las fusiones transcripcionales de *bfpA-cat* con recortes en 3'. En la parte superior se muestra la actividad de dichas fusiones en la cepa EPEC silvestre y en la cepa EPEC carente del plásmido EAF (JPN15). En la parte inferior se muestra un esquema de las fusiones. Los sitios de pegado de PerA (PBS) se indican con rectángulos sobre la secuencia.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



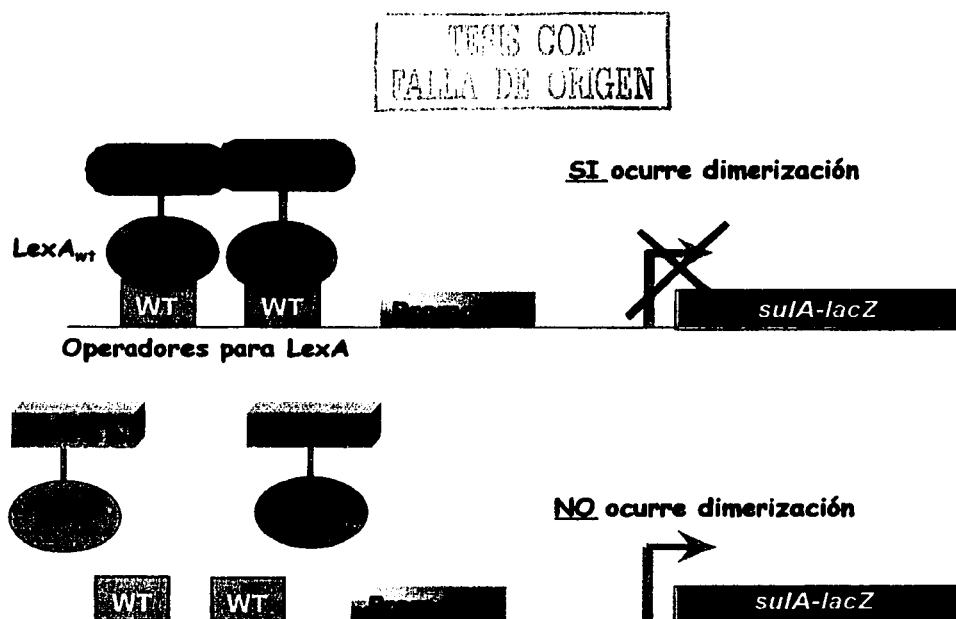
Cabe mencionar que el sistema se probó con tres testigos positivos de interacción. LexA-CAT (CAT tiene la capacidad de formar trímeros), LexA-HNS (H-NS tiene la propiedad de formar dímeros y multímeros), y LexA-AraC (miembro de la misma familia que PerA y que es capaz de formar dímeros), para los cuales se observó una disminución de la actividad de la fusión (Fig. 21). Al probar la fusión LexA-PerA no se observó disminución de la actividad de la proteína reportera (Fig. 21). Con este dato, se favorece, por el momento, la idea de que PerA, a diferencia de AraC, UreR y VirF; pero al igual que Rns, actúa como monómero. Actualmente, no se puede excluir la posibilidad de que PerA dimerice al entrar en contacto con su región de pegado en el DNA, o bien que dicha interacción ocurra *in vivo*. En un ensayo de entrecruzamiento de la proteína MBP-PerA purificada no se detectó la formación de dímeros, lo que refuerza la idea de que PerA actúa como monómero (datos no mostrados).

### **Dominantes negativas.**

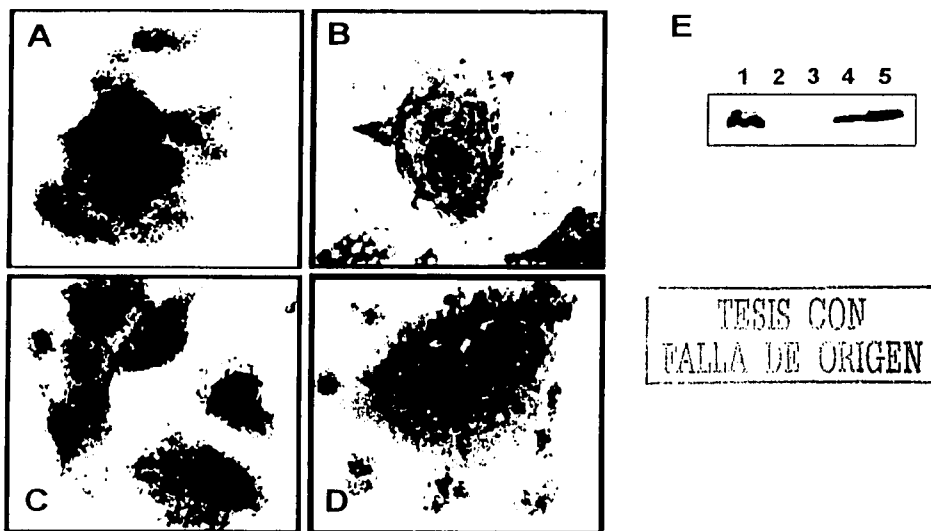
Con el fin de complementar la observación de que PerA estuviera actuando como un monómero, se usó la estrategia de dominancia negativa. Esta estrategia se ha usado para determinar si una proteína es capaz de formar dímeros *in vivo* (Porter y Dorman, 2002; Hulbert y Taylor, 2002). En este tipo de experimentos se sobreproduce el dominio amino terminal con la idea de que éste capture a la proteína silvestre, impidiéndole activar su gen o genes blanco.

Para este fin, se usó el plásmido pAITmb21 el cual contiene un sitio *Bgl*II en el probable conector de PerA y se procedió a generar un codón de paro (ver materiales y métodos). La ausencia de la proteína PerA silvestre en las mutantes se determinó por

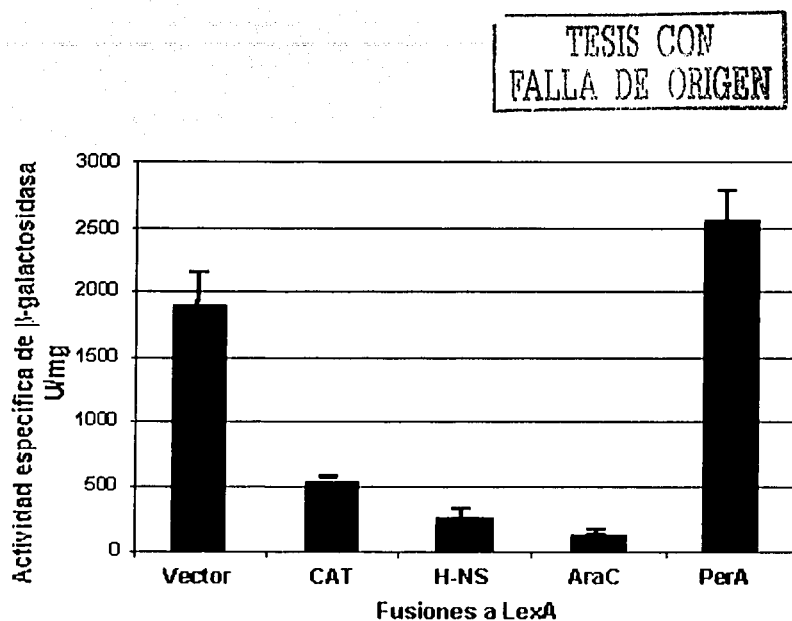
"Western-blot" con el anticuerpo anti-PerA (dato no mostrado). Posteriormente, se probó su efecto en una cepa EPEC E2348/69 con la fusión *bfpA-cat* (Fig. 22). Como se puede observar, la actividad de la fusión no se ve afectada por la sobreproducción del extremo amino terminal de PerA, lo que refuerza la idea de que PerA estaría actuando como un monómero. También es posible que el dominio de dimerización se localice en el extremo carboxilo terminal, aunque la probabilidad es baja pues dentro de esta familia no se han detectado interacciones intermoleculares en este dominio.



**Figura 19.** Mecanismo de detección de interacciones proteína-proteína basado en el sistema LexA desarrollado por Dmitrova et al. 1998. Los cilindros en la parte superior muestran una probable proteína que tiene la capacidad de dimerización y que al interaccionar reprime la fusión *sulA-lacZ*. En la parte inferior se muestra una proteína que no forma dímeros y que, por tanto, no reprime la fusión. Las cajas con las siglas WT señalan los operadores de tipo silvestre (WT) para LexA.



**Figura 20.** Complementación de una mutante *perA::km* con las fusiones LexA-PerA usados en el sistema de interacciones proteína-proteína. En los panel A-D se muestra la adherencia de las cepas E:2348/69 silvestre (A), *perA::km* (B), *perA::km/pMI659PerA* (C) y *perA::km/pMI660PerA* (D). En el panel E se muestra la inmunodetección de la proteína BfpA en la cepa silvestre (1), *perA::km* (2), *perA::km/pSR660* (3), *perA::km/pMI659PerA* (4) y *perA::km/pMI660PerA*.



**Figura 21.** Actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *sulA-lacZ* en la cepa *E. coli* SU101 para determinar interacciones proteína-proteína en PerA. Como control negativo se usó el plásmido pSR660 que expresa sólo el dominio amino terminal de LexA. Como controles positivos se usaron las fusiones de las proteínas CAT, H-NS y AraC a LexA. La fusión LexA-PerA está codificada en el plásmido pM1660PerA. Se muestra el resultado promedio de 3 ensayos diferentes a una  $DO_{600}=0.8$  y su desviación estándar.

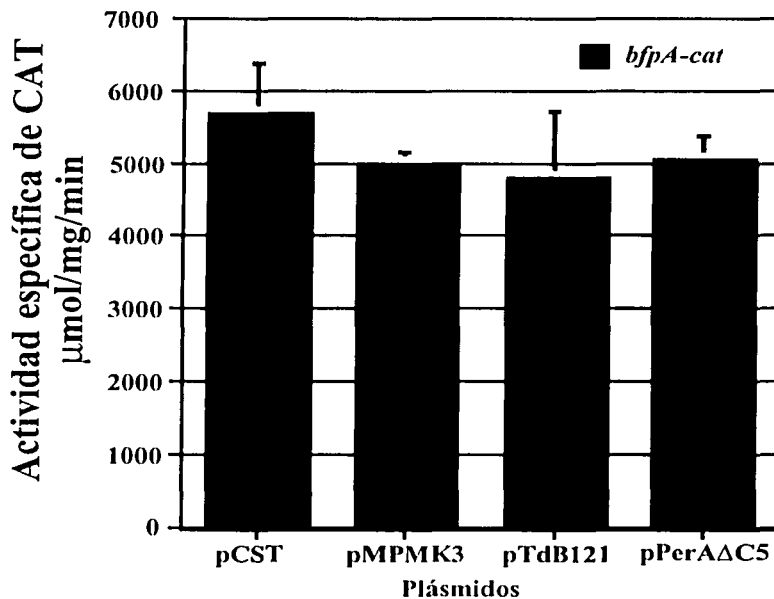


Figura 22. Actividad de la fusión *bfpA-cat* en la cepa E2348/69 complementada con: el vector (pMPMK3), pCST (*perA* silvestre), una eliminación de un posible plegamiento  $\beta$  de PerA en el extremo amino terminal (pAITdB121) y la construcción en la que se eliminó el extremo carboxilo terminal de la proteína (pPerA $\Delta$ C5). La actividad de CAT se determinó a una  $DO_{600} = 1.4$  en medio DME con IPTG 0.1 mM a 37°C.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VI. Discusión.

PerA es un activador que es necesario para la expresión de los genes de la biogénesis del BFP y para su propia expresión (Tobe et al. 1996; Martínez-Laguna et al. 1999), y, por lo tanto, para la de los genes que están en el operón *per*. Además, ha sido involucrado en la regulación de genes localizados en las diferentes islas de patogenicidad de EPEC (Mellies et al. 1999; Tobe et al. 1999a). Dada su importancia en la regulación de factores de virulencia de EPEC, el objetivo de este estudio fue determinar el sitio de pegado de PerA en los genes *bfpA* y *perA*, además de definir si, al igual que otros reguladores, PerA es capaz de formar dímeros.

PerA se purificó como una proteína de fusión a MBP y se comprobó que dicha fusión era funcional al complementar una mutante *perA::km*. En la purificación se observó, además del producto esperado, una proteína de menor tamaño que pudiera ser producto de un procesamiento de MBP-PerA. Este producto, MBP-PerA<sup>NII</sup>, se observó a pesar de adicionar 3 inhibidores de proteasas y de producir la proteína en mutantes de las proteasas Lon y ClpP. No podemos descartar que MBP-PerA<sup>NII</sup> sea producto de un procesamiento proteolítico, pero otra posibilidad es que esté ocurriendo un procesamiento post-transcripcional. Ambas posibilidades son consistentes con la observación de que al eliminar la región donde aparentemente ocurre el procesamiento, PerA se sobreproduce (Ibarra et al. datos no mostrados). Además de definir el mecanismo que genera a este subproducto, queda por establecer su relevancia biológica, la cual podría estar asociada al control de los niveles de PerA, como un mecanismo que le evite alcanzar concentraciones tóxicas para la célula o para modular la expresión de sus genes blanco.

La fusión MBP-PerA fue capaz de retardar regiones de DNA que contenían los probables sitios de pegado tanto en *hfpA* como en *perA*, pero no fragmentos u oligos que no la contenían. Los ensayos de protección a DNasa I y los retardos de diferentes oligonucleótidos, nos permitieron comprobar que, para *hfpA*, la región de -85 a -46 propuesta por Bustamante et al. (1998) es, efectivamente, la región de pegado de PerA. Con los EMSA de los oligos de diferentes longitudes, se propone que el sitio de unión comprende al menos 40 pb, y que las secuencias vecinas en los extremos 5' y 3' podrían ser importantes para estabilizar dicha interacción (Tabla 4).

Los miembros de la familia AraC/XylS se caracterizan por unirse a regiones que van de 17 a 60 pb. Las proteínas que sólo poseen la secuencia correspondiente al dominio de unión a DNA (carboxilo-terminal), MarA, Rob y SoxS, y que interactúan en forma monomérica con el DNA, se unen a secuencias de 19 a 21 pb (Rhee et al. 1998; Griffith y Wolf, 2001). Por otro lado, un dímero de AraC, el prototipo de la familia, se une a dos secuencias repetidas de 17 pb, separadas por 6 pb, que pueden ser vecinas o estar distantes (Hendrickson y Schleif, 1985). Al igual que este último, XylS, MelR, Rns y RhaS se unen a secuencias de entre 33 a 56 pb que generalmente presentan dos sitios de unión de 15 a 20 pb separados por 6 a 15 pb (Bourgerie et al. 1997; Tamai et al. 2000; González-Pérez et al. 1999; Munson y Scott, 2000; Bhende y Egan, 2000). Como hemos determinado en este estudio, la región protegida y retardada en oligonucleótidos de doble cadena de *hfpA* y *perA* es de aproximadamente 40 pb, lo cual es congruente con lo que se ha determinado para otros miembros de la familia AraC/XylS.

La identificación de un segundo sitio de pegado dentro de la región estructural del gen *hfpA* entre las posiciones +43 a +106, es consistente con lo descrito previamente para Rns (Munson y Scott, 2000) y algunos otros miembros de la familia AraC/XylS

involucrados en la regulación de factores de virulencia (Munson et al. 2001). A diferencia de PerA, Rns requiere de la presencia, además del sitio localizado arriba del promotor, de un sitio de unión ubicado en la región estructural para activar la expresión de los genes a los que regula. En el caso de PerA, la afinidad por el segundo sitio de unión es menor comparada con la del primero (aproximadamente del 50%), como lo demostraron los experimentos de retardo de oligonucleótidos (Fig. 17). Además, el segundo sitio de pegado no fue necesario para que una fusión transcripcional *bfpA-cat* se expresara adecuadamente en presencia de PerA, y sí, en cambio, se expresó 0.6 veces más que una fusión que lo contenía parcialmente. De esta manera, se concluye que el sitio de unión interno de PerA no es necesario para la expresión, pero que, por el contrario, podría ser parte de un mecanismo que modula la expresión de *bfpA*, ya sea debido a la interacción de la misma PerA o a la interacción de un regulador negativo con el que compite PerA.

El hecho de que un activador se una a regiones corriente abajo del promotor es novedoso para proteínas de este tipo y aún se desconoce cuál es su significado biológico. En experimentos *in vitro*, la existencia de estos dos sitios de unión para Rns permite la unión de la RNA polimerasa y la formación de complejos abiertos (Munson y Scott, 2000). No se puede descartar que la unión dentro del gen estructural tenga la función de eliminar una estructuración compleja del DNA en esa región. También es probable que sea el sitio de pegado de un modulador negativo, que, en este caso, podría ser un regulador global, ya que se observó el mismo efecto en una cepa de *E. coli* K12. Otra posibilidad es que el mismo PerA esté modulando la expresión de BfpA cuando éste alcance determinados niveles de expresión. Una perspectiva es que se realicen experimentos de "footprinting" *in vivo* con dimetil-sulfato para determinar si este segundo sitio de unión está siendo ocupado.



Para el caso de *perA*, con los experimentos de protección se determinó que el sitio de unión correlacionaba parcialmente con el propuesto por Bustamante et al. (1998), ya que éste se extendía 17 pb hacia el extremo 5' de la región de homología entre las regiones reguladoras de *perA* y *hfpA*. Sin embargo, este resultado concuerda con lo observado por Martínez-Laguna et al. (1999) que, utilizando recortes en la región promotora de *perA* en fusiones transcripcionales, demostraron que se requiere como mínimo hasta el residuo -81 para la expresión de *perA* dependiente de PerA.

El estudio de EMSA realizado con varios fragmentos de la región promotora y estructural de *perA*, nos indica que podría existir, también, un segundo sitio de interacción que estaría entre las posiciones +180 a +476. Queda como perspectiva el realizar experimentos de protección a DNasa I en esta región, además de construir fusiones más extensas en 3' para definir si tiene algún papel en la modulación de la expresión. Es poco probable que el segundo sitio en *perA* sea indispensable para la expresión del gen, pues los resultados de Martínez-Laguna et al. (1999) indican que una fusión transcripcional hasta +75 contiene todos los elementos que permiten su activación y regulación por PerA. Por otro lado, y alrededor de la posible función del segundo sitio en *perA*, Shin y col. (2001) encontraron que GadX, un regulador de la misma familia que PerA, regula de manera parcial y negativamente la expresión de *perA* en condiciones de pH ácido. Así, la existencia de otro sitio de pegado de PerA en *perA* podría estar eliminando la modulación negativa ejercida por GadX. Aunque no se descarta que PerA tenga funciones de modulador negativo, como ya se propuso para *hfpA*.



MBP-PerA. Así, la identidad en la región disminuyó al 51.2 % (panel A). Al alinear el segundo sitio de unión de PerA en *hfpA*, se pueden resaltar algunos residuos que, dada su conservación en la secuencia, podrían ser indispensables para la unión de la proteína.

La asimetría de esta secuencia, y los datos descritos anteriormente, apuntan a que PerA podría interactuar en forma monomérica con el DNA. Más aún, resalta el hecho de que el sitio de unión para PerA en ambos genes es similar en tamaño a los definidos para otros miembros de la familia AraC, donde se ha visto que llegan a unirse a secuencias de 40 a 56 pb (Bourgerie et al. 1997; Tamai et al. 2000; González-Pérez et al. 1999; Munson y Scott, 2001; Bhende y Egan, 2000). En los casos más estudiados, se ha demostrado que los miembros de la familia AraC/XylS actúan como dímeros (Hendrickson y Schleif, 1985; Egan y Schleif, 1994). Sin embargo, las propiedades de dimerización para los miembros de la familia involucrados en la regulación de factores de virulencia no ha sido analizado en detalle. Dentro de estos últimos, se ha propuesto que Rns, que también es un activador de genes para la biogénesis de pili involucrados en virulencia, actúa como monómero a pesar de unirse a regiones de 38 pb (Munson y Scott, 1999). Esto se desprende de la observación de que Rns sólo interactúa con regiones de dos surcos mayores del DNA dentro del sitio de pegado, lo cual es coincidente con lo observado para monómeros de las proteínas MarA y Rob, miembros de esta familia de reguladores (Fig. 23) (Rhee et al. 1998; Kwon et al. 2000).

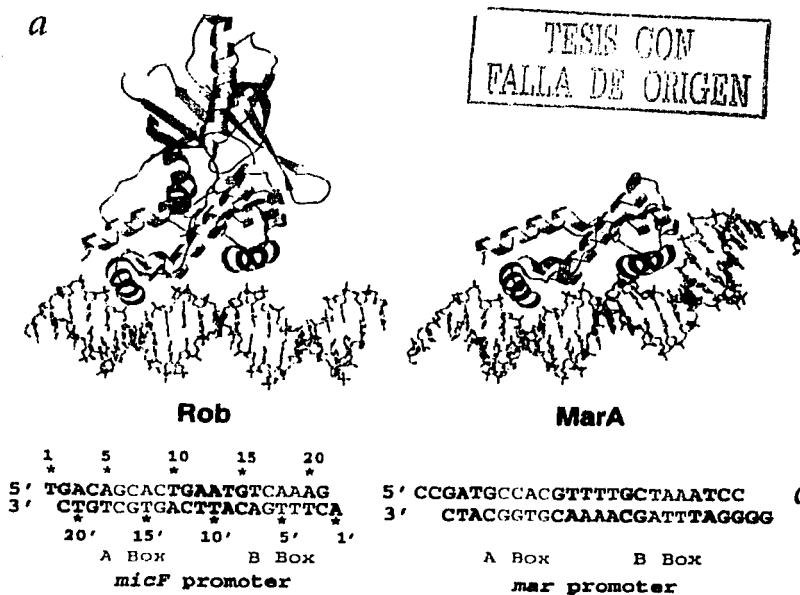
Para determinar si PerA es capaz de formar dímeros o multímeros, se utilizó un sistema basado en el extremo amino terminal de la proteína LexA para detectar interacciones proteína-proteína *in vivo* (Dmitrova et al. 1998; Daines y Silver, 2000). El sistema tiene la ventaja de que se pueden fusionar proteínas completas de las cuales se quiere probar su capacidad para interactuar entre sí o con otras proteínas. Además, el

sistema fue validado con proteínas que se sabe tienen la capacidad de interactuar, como son el regulador global bacteriano H-NS, la enzima CAT (cloranfenicol acetil transferasa) y la proteína AraC, prototipo de la familia. Al probar la fusión LexA-PerA en el sistema, no se detectó interacción (Fig. 21). Consistentemente con lo anterior, el programa COILS (Russell y Lupas, 1996), el cual predice motivos estructurales tipo "coiled-coil" (bobina) que favorecen la dimerización entre proteínas, mostró que PerA no posee dichas estructuras. La utilidad de dicho programa se validó con la secuencia de AraC, la cual posee una región de bobina en el extremo amino terminal y cuya importancia en la dimerización ha sido demostrada y comprobada por cristalografía (Hendrickson y Schleif, 1985; Bustos y Schleif, 1993; Soisson et al. 1997).

Por otro lado, la posibilidad de que PerA esté actuando como monómero se vio reforzado por el uso de posibles dominantes negativas de PerA. Esta estrategia ha sido usada previamente para demostrar interacciones en otros miembros de la familia AraC, tales como VirF y ToxT (Poore et al. 2001; Porter y Dorman, 2002; Hulbert y Taylor, 2002). Así, los resultados obtenidos demostraron que la sobreproducción del extremo amino terminal, que sería el que contendría probablemente el dominio de dimerización, no interfería con la capacidad de la proteína silvestre de activar la fusión *bfpA-cat*.

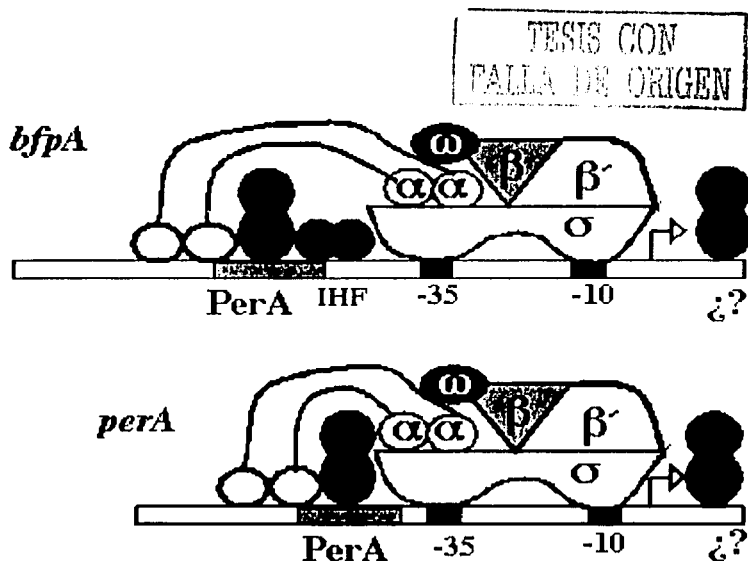
En su conjunto, estos resultados sugieren que PerA, como se propone para Rns, está uniéndose a su sitio de pegado como monómero (Fig. 24), aunque no se descarta que dos monómeros independientes interactúen con el DNA, o que la interacción proteína-proteína sólo ocurra en presencia del sitio de unión; esto es, que la unión al DNA establezca la interacción. Una vez unido al DNA, PerA posiblemente lleve a cabo interacciones con la RNA polimerasa (RNAP) para iniciar la transcripción. De acuerdo a resultados recientes (Martinez-Laguna et al. datos no publicados), es posible que IHF se una a la región de

DNA entre PerA y la RNAP en la región promotora de *bfpA*; mientras que para el caso de *perA* no parece ser necesario algún otro factor (Fig. 24).



**Figura 23.** Interacción de Rob y MarA con el DNA. El cristal de MarA demostró que cada uno de los dos dominios HTH se introducen a un surco mayor del DNA y ocasionan un doblamiento del mismo. Por otro lado, en el caso de Rob, sólo el HTH1 está dentro del surco mayor del DNA y el HTH2 interacciona con el esqueleto de fosfatos. Tomado de Kwon et al. 2000.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



**Figura 24.** Posible modelo de activación de los genes *bfpA* y *perA* por el activador transcripcional PerA. En el promotor del gen *bfpA* PerA probablemente interacciona con el dominio carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha$  de la RNAP. Además, IHF se uniría al segmento de DNA entre el sitio de unión de PerA y la RNAP, favoreciendo la interacción entre ambas. En el promotor de *perA*, PerA podría establecer contactos con las subunidades  $\alpha$  y  $\sigma$  de la RNAP, esto basado en lo que se ha observado para otros reguladores transcripcionales, incluidos los de la familia AraC/XylIS (Gallegos et al. 1997; Dhiman y Schleif, 2000; Ruiz et al. 2001; ).

## VII. Conclusiones.

En este trabajo se logró la purificación de PerA y se determinó su interacción con los promotores en los genes *bfpA* y *perA*, definiendo el sitio mínimo de pegado para ambas regiones y una posible secuencia consenso. También se demostró la existencia de un segundo sitio de unión en *bfpA* localizado corriente abajo del promotor y dentro del gen estructural. En el caso de *bfpA*, el segundo sitio no es indispensable para la expresión del gen, pero parece modular negativamente la actividad de *bfpA*. Además, se aportaron evidencias que sugieren que PerA no dimeriza, por lo que es muy probable que un monómero actúe en los sitios de pegado.

## Bibliografía

- Abul-Milh, M., Y. Wu, B. Lau, C.A. Lingwood, and D.B. Foster. 2001. Induction of epithelial cell death including apoptosis by enteropathogenic *Escherichia coli* expressing bundle-forming pili. *Infect Immun.* **69**:7356-7364.
- Alagón, A.C., and T.P. King. 1980. Activation of polysaccharides with 2-iminothiolane and its uses. *Biochemistry* **19**: 4341-4345
- Aldridge, P., and K.T. Hughes, 2001. How and when are substrates selected for type III secretion? *Trends Microbiol.* **9**: 209-214
- Anantha, R.P., K.D. Stone, and M.S. Donnenberg. 1998. Role of BfpF, a member of the PilT family of putative nucleotide-binding proteins, in type IV pilus biogenesis and in interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host cells. *Infect Immun.* **66**:122-131.
- Anantha, R.P., K.D. Stone, and M.S. Donnenberg, 2000. Effects of *hfp* mutations of functional enteropathogenic *Escherichia coli* type IV pili. *J. Bacteriol.* **182**: 2498-24506
- Baldini M.M., J.B. Kaper, M.M. Levine, D.C. Candy and H.W. Moon. 1983. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2**: 534-538
- Barnett-Foster, D., D. Philpott, M. Abul-Milh, M. Huesca, P.M. Sherman, and C.A. Lingwood. 1999. Phosphatidylethanolamine recognition promotes enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* host cell attachment. *Microb Pathog.* **27**:289-301
- Baxter, M.A., T.F. Fahlen, R.L. Wilson, and B.D. Jones. 2003, HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect. Immun.* **71**: 1295-1305
- Bhende, P.M., and S.M. Egan. 2000. Genetic evidence that transcription activation by RhaS involves specific amino acid contacts with sigma 70. *J. Bacteriol.* **182**: 4959-4969
- Bieber, D., S.W. Ramer, C.Y. Wu, W.J. Murray, T. Tobe, R. Fernandez, and G.K. Schoolnik. 1998. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **280**: 2114-2118
- Blattner, F.R., G. Plunkett III, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J.D. Glasner, C.K. Rode, et al. . 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1462
- Bourgerie, S.J., C.M. Michán, M.S. Thomas, S.J.W. Busby, and B.I. Hyde. 1997. DNA binding and DNA bending by the MelR transcription activator protein from *Escherichia coli*. *Nucl. Ac. Res.* **9**:1685-1693
- Bustamante, V.H., E. Calva, and J.L. Puente. 1998. Analysis of *cis*-acting elements required for *hfpA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 3013-3016

- Bustamante, V.H., F.J. Santana, E. Calva, and J.L. Puente. 2001. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *E. coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol. Microbiol.* **39**: 664-678.
- Bustos, S.A., and R. Schleif. 1993. Functional domains of the AraC protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5638-5642
- Büttner, D., and U. Bonas. 2002. Port of entry –the type III secretion translocon. *Trend Microbiol.* **10**: 186-192
- Cantarelli, V. V., A. Takahashi, I. Yanagihara, Y. Akeeda, K. Imura, T. Kodama, G. Kono, Y. Sato, and T. Honda. 2001. Talin, a host cell protein, interacts directly with the translocated intimin receptor, Tir, of enteropathogenic *Escherichia coli*, and is essential for pedestal formation. *Cell Microbiol.* **3**:745-751
- Carey, J. 1988. Gel retardation at low pH resolves *irp* repressor-DNA complexes for quantitative study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 975-979
- Carey, J. 1991. Gel retardation. *Meth. Enzymol.* **208**: 103-117
- Celli, J., M. Olivier, and B.B. Finlay. 2001. Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. *EMBO J.* **20**:1245-1258.
- Crane, J. K., and J. S. Oh. 1997. Activation of host cell protein kinase C by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **65**:3277-3285
- Crane, J. K., B. P. McNamara, and M. S. Donnenberg. 2001. Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* **3**:197-211
- Cravioto A., R.J. Gross, S.M. Scotland, and B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microb.* **3**: 95-99
- Czerucka, D., S. Dahan, B. Mograbi, B. Rossi, and P. Rampal. 2001. Implication of mitogen-activated protein kinases in T84 cell responses to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun.* **69**:1298-1305.
- Daines, D.A., and R.P. Silver. 2000. Evidence for multimerization of Neu proteins involved in polysialic acid synthesis in *Escherichia coli* K1 using improved LexA-based vectors. *J. Bacteriol.* **182**: 5267-5270
- Darwin, K. H., and V. L. Miller. 2001. Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.* **20**:1850-1862.
- Deng, W., B. A. Vallance, Y. Li, J.L. Puente, and B.B. Finlay. 2003. *Citrobacter rodentium* translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice. *Mol. Microbiol.* **48**: 95-115



- DeVinney, R., J. L. Puente, A. Gauthier, D. Goosney, and B. B. Finlay. 2001. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. *Mol Microbiol.* **41**:1445-1458
- de Grado, M., C. M. Rosenberger, A. Gauthier, B. A. Vallance, and B. B. Finlay. 2001. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection induces expression of the early growth response factor by activating mitogen-activated protein kinase cascades in epithelial cells. *Infect Immun.* **69**:6217-6224.
- Dhiman, A., and R. Schleif. 2000. Recognition of overlapping nucleotides by AraC and the sigma subunit of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **182**: 5076-5081
- Dmitrova, M., G. Younès-Cauet, P. Oertel-Buchheit, D. Porte, M. Schnarr, and M. Granger-Schnarr. 1998. A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **257**: 205-212
- Edwards, R., and J.L. Puente. 1998. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol.* **6**: 282-287
- Egan, S.M., and R. Schleif. 1994. DNA-dependent renaturation of an insoluble DNA binding protein. Identification of RhaS binding site at *rhaBAD*. *J. Mol. Biol.* **243**: 87-98
- Elliott, S.J., L.A. Wainwright, T.K. MacDaniel, B. MacNamara, L.C. Lai, M.S. Sonnenberg, and J.B. Kaper. 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE), from enteropathogenic *E. coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* **28**: 1-4
- Elliott, S. J., E. O. Krejany, J. L. Mellies, R. M. Robins-Browne, C. Sasakawa, and J. B. Kaper. 2001. EspG, a novel type III system-secreted protein from enteropathogenic *Escherichia coli* with similarities to VirA of *Shigella flexneri*. *Infect Immun.* **69**:4027-4033
- Fancy D.A., and T. Kodadek 1999. Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:6020-6024.
- Farmer III, J.J., and M.T. Kelly. Enterobacteriaceae. En: *Manual of Clinical Microbiology* 5th edition. 1991. Editores: Balows, A., W.J. Hausler Jr, K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy. American Society for Microbiology, Washington DC: 360-383
- Fawcett, W.P., and R.E. Wolf Jr. 1994. Purification of a MalE-SoxS fusion protein and identification of the control sites of *Escherichia coli* superoxide-inducible genes. *Mol. Microbiol.* **14**: 669-679
- Fernández, L.A., and J. Berenguer. 2000. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 21-44
- Foubister, V., I. Rosenshine, and B.B. Finlay. 1994. A diarrheal pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) triggers a flux of inositol phosphates in infected epithelial cells. *J. Exp. Med.* **179**: 993-998

- Freeman, N. L., D. V. Zurawski, P. Chowrashi, J. C. Ayoob, L. Huang, B. Mittal, J. M. Sanger, and J. W. Sanger. 2000. Interaction of the enteropathogenic *Escherichia coli* protein, translocated intimin receptor (Tir), with focal adhesion proteins. *Cell Motil Cytoskeleton*. **47**:307-318.
- Friedberg, D., T. Umanski, Y. Fang, and I. Rosenshine. 1999. Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **34**:941-952.
- Frischknecht, F., and M. Way. 2002. Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization. *Trends Cell Biol*. **11**:30-38
- Gallegos, M.T., R. Schleif, A. Bairoch, K. Hofman, and J.L. Ramos. 1997. The AraC/ XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 393-410
- Girón J.A., A.S.Y. Ho, and G.K. Schoolnik. 1991. An inducible Bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**: 710-713
- Girón, J. A., A. G. Torres, E. Freer, and J. B. Kaper. 2002. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol*. **44**:361-379.
- Gomez-Duarte, O.G., and J.B. Kaper. 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**:1767-1776
- González-Pérez, M.M., J.L. Ramos, M.T. Gallegos, and S. Marqués. 1999. Critical nucleotides in the upstream region of the XylS-dependent TOL *meta*-cleavage pathway operon promoter as deduced from analysis of mutants. *J. Biol. Chem.* **274**: 2286-2290
- Goosney, D. L., J. Celli, B. Kenny, and B. B. Finlay. 1999. Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits phagocytosis. *Infect Immun.* **67**:490-495.
- Goosney, D. L., R. DeVinney, R. A. Pfuetzner, E. A. Frey, N. C. Strynadka, and B. B. Finlay. 2000. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin. *Curr. Biol.* **10**:735-738.
- Goosney, D. L., R. DeVinney, and B. B. Finlay. 2001. Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. *Infect Immun.* **69**:3315-3322.
- Griffith, K.L., and R.E. Wolf. 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
- Gruenheid, S., R. DeVinney, F. Bladt, D. Goosney, S. Gelkop, G. D. Gish, T. Pawson, B. B. Finlay. 2001. Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat. Cell Biol.* **3**: 856-859
- Hendrickson, W., and R. Schleif. 1985. A dimer of AraC protein contacts three adjacent major groove regions of the *araI* DNA site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 3129-3133

- Hicks, S., G. Frankel, J. B. Kaper, G. Dougan, and A. D. Phillips. 1998. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infect Immun.* **66**:1570-1578
- Hobbs, M., and J.S. Mattick. 1993. Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer system, filamentous phage and protein secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Mol. Microbiol.* **10**: 233-243
- Hovey, A.K., and D.W. Frank. 1995. Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J. Bacteriol.* **177**: 4427-4436
- Hulbert, R. R., and R. K. Taylor. 2002. Mechanism of ToxT-Dependent Transcriptional Activation at the *Vibrio cholerae tcpA* Promoter. *J. Bacteriol.* **184**:5533-5544
- Ide, T., S. Laarmann, L. Greune, H. Schillers, H. Oberleithner, and M. A. Schmidt. 2001.Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* **3**:669-679.
- Jarvis, K. G., J. A. Giron, A. E. Jerse, T. K. McDaniel, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:7996-8000.
- Kaldalu, N., U. Toots, V. de Lorenzo, and M. Ustav. 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**:389-691.
- Kenny, B., A. Abe, M. Stein, and B.B. Finlay. 1997a. Enteropathogenic *E. coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* **65**: 2606-2612
- Kenny, B., R. DeVianney, M. Stein, D.J. Reinscheid, E.A. Frey, and B.B. Finlay. 1997b. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**: 511-520
- Kenny, B. 1999. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol.* **31**:1229-1241.
- Kenny, B., and M. Jepson. 2000. Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. *Cell Microbiol.* **2**:579-590.
- Kenny, B. 2001. The enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (serotype O157:H7) Tir molecule is not functionally interchangeable for its enteropathogenic *E. coli* (serotype O127:H6) homologue. *Cell Microbiol.* **3**:499-510.

- Kenny, B., and J. Warawa. 2001. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule does not undergo full modification when introduced into host cells by EPEC-independent mechanisms. *Infect Immun.* **69**:1444-1453.
- Kenny, B. 2002. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) - a crafty subversive little bug. *Microbiology.* **148**:1967-1978.
- Kenny, B., S. Ellis, A. D. Leard, J. Warawa, H. Mellor, and M. A. Jepson. 2002. Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. *Mol Microbiol.* **44**:1095-1107.
- Knutton, S., J. Adu-Bobie, C. Bain, A.D. Phillips, G. Dougan, and G. Frankel. 1997. Down regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion. *Infect. Immun.* **65**: 1644-1652
- Knutton, S., I. Rosenshine, M.J. Pallen, I. Nissan, B.C. Neves, C. Bain, C. Wolff, G. Dougan, and G. Frankel. 1998. A novel EspA associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J.* **17**: 2166-2176
- Knutton, S., R. K. Shaw, R. P. Anantha, M. S. Sonnenberg, and A. A. Zorngani. 1999. The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. *Mol Microbiol.* **33**:499-509.
- Khursigara, C., M. Abul-Milh, B. Lau, J. A. Giron, C. A. Lingwood, and D. E. Foster. 2001. Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence factor bundle-forming pilus has a binding specificity for phosphatidylethanolamine. *Infect Immun.* **69**:6573-6579
- Kwon, H. J., M. H. Bennik, B. Dimple, and T. Ellenberger. 2000. Crystal structure of the *Escherichia coli* Rob transcription factor in complex with DNA. *Nat Struct Biol.* **7**:424-430.
- Lane, D., P. Prentki, and M. Chandler. 1992. Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol. Revs.* **56**: 509-528
- Levine, MM. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**: 377-389
- Lommel S, S. Benesch, K. Rottner, T. Franz, J. Wehland, and R. Kuhn. 2001. Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep.* **2**:850-857.
- McNamara, B. P., A. Koutsouris, C. B. O'Connell, J. P. Nougayrede, M. S. Sonnenberg, and G. Hecht. 2001. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J Clin Invest.* **107**:621-629
- Martinez-Laguna, Y., E. Calva, and J.L. Puente. 1999. Autoactivation and environmental regulation of *hfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *hfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **33**: 153-166

- Mayer, M.P., 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**: 41-46
- Mellies, J. I., S.J. Elliot, V. Sperandio, M.S. Donnenberg, and J.B. Kaper. 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
- Munson, G.P., and J.R. Scott. 1999. Binding site recognition by Rns, a virulence regulator in the AraC family. *J. Bacteriol.* **181**: 2110-2117
- Munson, G.P., and J.R. Scott. 2000. Rns, a virulence regulator within the AraC family, requires binding sites upstream and downstream of its own promoter to function as an activator. *Mol. Microbiol.* **36**: 1391-1402
- Munson, G.P., L.G. Holcomb, and J.R. Scott. 2001. Novel group of virulence activators within the AraC family that are not restricted to upstream binding sites. *Infect. Immun.* **69**: 186-193
- Nataro, J.P., and J.B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* **11**: 142-201
- Oropeza, R., C.L. Sampieri, J.L. Puente, E. Calva. 1999. Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Mol. Microbiol.* **32**: 243-252.
- Pedraza-Alva, G., Merida L.B., Burakoff S.J., and Y. Rosenstein. 1996. CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase. *J. Biol Chem.* **271**: 27564-27568
- Plano, G.V., J.B. Day, and F. Ferracci. 2001. Type-III export: new uses for an old pathway. *Mol. Microbiol.* **40**: 294-293
- Poore, C.A., C. Coker, J.D. Dattelbaum, and H.L.T. Mobley. 2001. Identification of the domains of UreR, an AraC-like transcriptional regulator of the urease gene cluster in *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol.* **183**: 4526-4535
- Porter, M.E., and C.J. Dorman. 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
- Puente, J.L., D. Bieber, S.W. Ramer, W. Murray, and G.K. Schoolnik. 1996. The bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol. Microbiol.* **20**: 87-100
- Puente, J.L. and B.B. Finlay. 2001. Pathogenic *Escherichia coli*. In: Principles of bacterial pathogenesis. E. A. Groisman, editor. Academic Press, pp 717-743.
- Ramer, S.W., D. Bieber, and G.K. Schoolnik. 1996. BfpB, an outer membrane lipoprotein required for the biogenesis of bundle-forming pill in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 6555-6563.

- Ramer, S.W., G.K. Schoolnik, C.Y. Wu, J. Hwang, S.A. Schmidt, and D. Bieber. 2002. The type IV pilus assembly complex: biogenic interactions among the bundle-forming pilus proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **184**:3457-3465.
- Roder, K., and M. Schweizer. 2001. Running-buffer composition influences DNA-protein and protein-protein complexes detected by electrophoretic mobility-shift assay (EMSA). *Biotechnol. Appl. Biochem.* **33**: 209-214
- Rosenshine I., S. Ruschkowski, M. Stein, D.J. Reinscheid, S.D. Mills, and B.B. Finlay. 1996. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacteria receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO J.* **15**: 2613-2626
- Rhee, S., R.G. Martin, J.J. Rosner, and D.R. Davies. 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
- Ruiz, R., J.L. Ramos, and S.E. Egan 2001. Interactions of the XylS regulators with the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit influence the expression level from the cognate Pm promoter. *FEBS Lett* **491**: 207-211
- Russell, and A. Lupas. 1996. Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Meth. Enzymol.* **266**: 513-525.
- Sambrook, J.E., and D.W. Russell. 2000. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor, NY.
- Santana, M.A., G. Pedraza-Alva, N. Olivares-Zavaleta, V. Madrid-Marina, V. Horejsi, S.J. Burakoff, and Y. Rosenstein. 2000. CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NF $\kappa$ B transcription factors in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **275**: 31460-31468
- Savkovic, S. D., A. Koutsouris, and G. Hecht. 1996. Attachment of a noninvasive enteric pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli*, to cultured human intestinal epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils. *Infect Immun.* **64**:4480-4487.
- Savkovic, S. D., A. Koutsouris, and G. Hecht. 1997. Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Am J Physiol.* **273**:1160-1167.
- Schreiber, W., K.D. Stone, M.A. Strong, L.J. DeToalla, M. Hoppert, and M.S. Sonnenberg. 2002. BfpU, a soluble protein essential for type IV pilus biogenesis in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**: 2507-2518
- Sekiya, K., M. Ohishi, T. Ogino, K. Tamano, C. Sasakawa, and A. Abe. 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.
- Servin, A. 2002. Cell injuries by Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* in intestinal cells, an EPEC-like effect by a non-EPEC *E. coli*. 3<sup>rd</sup> International EPEC symposium. Abstract S6.5.
- Shaw, R. K., S. Daniell, F. Ebel, G. Frankel, and S. Knutton. 2001. EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. *Cell Microbiol.* **3**:213-22.

- Shi, W., and H. Sun. 2002. Type IV pilus-dependent motility and its possible role in bacterial pathogenesis. *Infect. Immun.* **70**: 1-4
- Shin, S., M.P. Castane-Cornet, J.W. Foster, J.A. Crawford, C. Brinkley, and J.B. Kaper. 2001. An activator of glutamate decarboxylase genes regulates expression of enteropathogenic *Escherichia coli*: virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. *Mol. Microbiol. Mol. Microbiol.* **41**:1133-1150.
- Sohel, I., J.L. Puente, W.J. Murray, J. Voupio-Varkila, G.K. Schoolnik. 1993. Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli*; and its distribution in *Salmonella* serotypes. *Mol. Microbiol.* **7**: 5679-5678.
- Sohel, I., J.L. Puente, S.W. Ramer, D. Bieber, C.Y. Wu, and G.K. Schoolnik. 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J. Bacteriol.* **178**:2613-2628.
- Soisson, S.M.; B. Mac-Dougall-Shackleton, R. Schleif, and C. Wolberger. 1997. Structural basis for ligand-regulated oligomerization of AraC. *Science* **276**: 421-425
- Sosa-Macias, M.G. 1999. Regulación transcripcional y traduccional del locus *bfpTVW* de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). Tesis de maestría.
- Sperandio, V., J.L. Mellies, R.M. Delahay, G. Frankel, J.A. Crawford, W. Nguyen, and J.B. Kaper. 2000. Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler. *Mol. Microbiol.* **38**:781-793.
- Sperandio, V., C. C. Li, and J.B. Kaper. 2002. Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. *Infect Immun.* **70**:3085-3093.
- Stone, K.D., H.Z. Zhang, L.K. Carlson, and M.S. Donnenberg. 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.
- Tamai, E., T.A. Belyaeva, S.J.W. Busby, and T. Tsuchiya. 2000. Mutations that increase the activity of the promoter of the *Escherichia coli* melibiose operon improve the binding of MelR, a transcriptional activator triggered by melibiose. *J. Biol. Chem.* **275**:17508-17063
- Tato, C.M. and C.A. Hunter. 2002. Host-pathogen interactions: subversion and utilization of the NF-kappa B pathway during infection. *Infect. Immun.* **70**: 3311-3317
- Taylor, K. A., P. W. Luther, and M. S. Donnenberg. 1999. Expression of the EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology. *Infect Immun.* **67**:120-125.
- Tobe, T., G.K. Schoolnik, I. Sohel, V.H. Bustamente, and J.L. Puente. 1996. Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcription activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**: 963-969

- Tobe, T., I. Tatsuno, E. Katayama, C.V. Wu, G.K. Schoolnik, and C. Sasakawa. 1999a. A novel chromosomal locus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), which encodes a *hfpT*-regulated chaperone-like protein, TrcA, involved in microcolony formation by EPEC. *Mol. Microbiol.* **33**:741-752
- Tobe, T., T. Hayashi, C.G. Han, G. K. Schoolnik, E. Ohtsubo, and C. Sasakawa. 1999b. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. *Infect Immun.* **67**:5455-5462
- Tobe, T., and C. Sasakawa. 2001. Role of bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* in host cell adherence and in microcolony development. *Cell Microbiol.* **3**: 579-585.
- Tobias, J.W., T.E. Shrader, G. Rocap, and A. Varshavsky. 1992. The N-rule in bacteria. *Science* **254**: 1374-1377
- Tomoyasu, T., A. Mogk, H. Langen, P. Goloubinoff, and B. Bukau. 2001. Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol Microbiol* **40**:397-413.
- Tramonti, A., P. Visca, M. De Canio, M. Falconi, and D. DeBiase. 2002. Functional characterization and regulation of *gadX*, a gene encoding an AraC/XylS-like transcriptional activator of the *Escherichia coli* glutamic acid decarboxylase system. *J. Bacteriol.* **184**:2603-2613.
- Tu, X., I. Nisan, C. Yona, E. Hanski, and I. Rosenshine. 2003. EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **47**: 595-606
- Vuopio-Varkila, J., and G. K. Schoolnik. 1991. Localized adherence by enteropathogenic *Escherichia coli* is an inducible phenotype associated with the expression of new outer membrane proteins. *J Exp Med.* **174**:1167-1177
- Warawa, J., B.B. Finlay, and B. Kenny. 1999. Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **67**: 5538-5540
- Warawa, J., and B. Kenny. 2001. Phosphoserine modification of the enteropathogenic *Escherichia coli* Tir molecule is required to trigger conformational changes in Tir and efficient pedestal elongation. *Mol. Microbiol.* **42**: 1269-1280
- Zhang, H.Z., S. Lory, and M.S. Donnenberg. 1994. A plasmid encoded prepilin peptidase gene from enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 6885-6891
- Zhang, H.Z., and M.S. Donnenberg. 1996. DsbA is required for stability of the type IV pilin of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**: 787-797



## **ANEXOS**

## **APENDICE I**

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## Identification of the DNA Binding Sites of PerA, the Transcriptional Activator of the *bfp* and *per* Operons in Enteropathogenic *Escherichia coli*

J. Antonio Ibarra, Miryam I. Villalba, and José Luis Puente\*

*Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional  
Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62251, México*

Received 11 October 2002/Accepted 30 January 2003

The bundle-forming pilus (BFP) is an important virulence factor for enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). Genes involved in its biogenesis and regulation are tightly regulated by PerA (BfpT), a member of the AraC/XylS family of transcriptional regulators. The aim of this work was to purify PerA and determine its association with *bfpA* and *perA* (*bfpT*) regulatory regions by electrophoretic mobility shift and DNase I footprinting assays. PerA was purified as a maltose-binding protein (MBP) fusion, which was capable of complementing *bfpA* expression and which was able to restore the localized adherence phenotype of an EPEC *perA* mutant strain. Upstream of *bfpA* and *perA*, MBP-PerA recognized with similar affinity asymmetric nucleotide sequences in which a 29-bp-long AT-rich consensus motif was identified. These DNA motifs share 65% identity and were previously shown, by deletion analysis, to be involved in the PerA-dependent expression of both genes. Interestingly, in *perA*, this motif spans the sequence between positions -75 and -47, approximately one helix turn upstream of the -35 promoter sequence, while in *bfpA*, it spans the sequence between positions -83 and -55, approximately two helix turns upstream from the promoter. An additional PerA binding site was identified at the 5' end of the *bfpA* structural gene, which was not required for its activation. Experiments with LexA-PerA fusions suggested that PerA acts as a monomer to activate the transcription of both *perA* and *bfpA*, in contrast to what has been documented for other members of this family of transcriptional regulators.

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains are a major cause of acute and persistent diarrhea in children and a leading cause of infant death in developing countries (28). EPEC infections are characterized by two distinctive phenotypes: localized adherence (LA) and formation of attaching-and-effacing lesions (A/E) (11, 53). The LA phenotype involves the initial adherence of EPEC to the intestinal brush border in a nonintimate fashion, forming discrete microcolonies on the surface of epithelial cells. This phenotype is mediated by the bundle-forming pilus (BFP), a long flexible filament that forms surface organelles (bundles) that interconnect individual bacteria to create tridimensional clusters. The genes required for the biogenesis of the BFP are encoded by the EAF plasmid (42, 45, 48), while those responsible for the A/E phenotype are chromosomally encoded within the locus for enterocyte effacement (LEE) (10). The expression of BFP is under the positive control of PerA (also known as BfpT), an AraC/XylS-like transcriptional activator encoded by the *per* operon, which contains the genes *perA*, *perB*, and *perC* (14, 49). Expression of the *bfp* operon is modulated by environmental and physiological cues, such as temperature, the presence of ammonium, and the growth medium (35). PerA also autoregulates its expression in a positive manner (23) and has been involved in the regulation of *ler*, a positive regulator of genes encoded within and outside

the LEE (9, 24), as well as that of *trcA*, a gene encoded within the locus for improving microcolony formation (LIM) (50). *perA* expression has also been shown to be modulated positively by a quorum-sensing mechanism (44) and negatively by GcdX, an activator of glutamate decarboxylase genes, under acidic conditions (41). The essential role of PerA in EPEC pathogenesis was established in a study with volunteers in which a *perA* mutant strain showed significantly reduced virulence (3).

The nucleotide sequence alignment of the *bfpA* and *perA* regulatory regions revealed significant identity in a 40-bp-long AT-rich tract segment located upstream from the putative promoters, which was previously shown by deletion analysis to be necessary for the PerA-dependent activation of both promoters (5, 23). However, the precise binding site had not been defined, mainly due to the difficulties in purifying PerA.

PerA contains two putative helix-turn-helix (HTH) motifs at the C-terminal domain and is more related to those members of the AraC family that regulate virulence factors (13). Rns, the transcriptional regulator of expression of CS1 and CS2 pili in enterotoxigenic *E. coli*, and ToxT, a transcriptional regulator of cholera toxin and toxin-coregulated pilus in *Vibrio cholerae*, are two of the best-characterized members of this subfamily of virulence regulators (19, 27, 55). Rns has been shown to recognize two DNA binding sites upstream of the transcription start site of the *coo* operon and three sequence motifs—one upstream and two downstream of the *ms* transcriptional start site (27). It has also been shown that Rns can activate the cognate promoters of other AraC-like proteins, such as VirF,

\* Corresponding author. Mailing address: Molecular Microbiology Department, Instituto de Biotecnología, UNAM, Avenida Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico. Phone: (52)(777) 3291621. Fax: (52)(777) 3138673. E-mail: puente@ibt.unam.mx.

TABLE 1. Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference	
Strains E2348/69	Wild-type EPEC O127:H26, NaI <sup>r</sup>	J. B. Kaper	
E2348/69	E2348/69 with a nonpolar insertional mutation in <i>perA</i>	Unpublished results	
<i>perA</i> ::Km			
JPN15	EAF plasmid-cured derivative of E2348/69, NaI <sup>r</sup>	J. B. Kaper	
MC4100	F <sup>-</sup> <i>araD139 (argF-lac)U169 rpsL 150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbcR</i>	Laboratory strain	
BL21/pLys21	F <sup>-</sup> <i>ompT (lon) hsdS<sub>B</sub> (r<sub>a</sub> m<sub>a</sub>) gal dcm (ADE3)</i>	Invitrogen	
KY2263	MC4100 <i>clpPX-lon</i> ::Cm	51	
KY2266	MC4100 <i>clpPX-lon</i> ::Cm <i>hslVU</i> ::Tc	51	
BB2395	MC4100 <i>lon146::miniTn10 Tc<sup>r</sup></i>	51	
SU101	<i>E. coli</i> J1. 1434 <i>lexA71::Tn5 (Def) sulA211 Δ (lacIPOZYA)169/F<sup>r</sup> lac<sup>r</sup> lacZM15::Tn9 (op<sup>+</sup>op<sup>+</sup>)</i>	8	
AQ: F	SU202	<i>E. coli</i> J1. 1434 <i>lexA71::Tn5 (Def) sulA211 Δ (lacIPOZYA)169/F<sup>r</sup> lac<sup>r</sup> lacZM15::Tn9 (op<sup>+</sup>op<sup>+</sup>408)</i>	8
Plasmids			
AQ: G	pCST	pACYC184 derivative carrying <i>perA (bfpT)</i>	23
AQ: H	pMalC2xa	Vector for constructing MBP fusions	New England Biolabs
	pMALT2	pMALC2xa derivative expressing MBP-PerA	This work
	pBR322-8	pBR322 derivative containing a promoterless <i>cat</i> gene	Pharmacia Biotech
	pCAT201	pKK232-8 derivative containing the <i>bfpA-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -201 to +76	5
	pCAT201 + 27	pKK232-8 derivative containing the <i>bfpA-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -201 to +27	Unpublished results
	pRS660	Vector encoding the LexA DBD sequence used for homodimerization studies. Tc <sup>r</sup> , <i>oriV</i>	7
	pM1660PerA	pRS660 derivative carrying the <i>lexA<sub>DBD</sub>-perA</i> fusion	This work
	pM1660PerA	pRS660 derivative carrying the <i>lexA<sub>DBD</sub>-perA</i> fusion	This work
	pRS658CAT	pRS660 derivative carrying the <i>lexA<sub>DBD</sub>-cat</i> fusion	7
	pRS658HNS	pRS660 derivative carrying the <i>lexA<sub>DBD</sub>-HNS</i> fusion	Unpublished results
	pMA660AraC	pRS660 derivative carrying the <i>lexA<sub>DBD</sub>-araC</i> fusion	This work

FapR, AggR, and CfaR, which, in turn, can replace Rns for the activation of the *coo* and *rns* promoters. However, Rns was not interchangeable with PerA (25).

The DNA sequences bound by AraC-like proteins involved in the regulation of virulence factors have been characterized for only few members of the subfamily, such as Rns (26), VirF of *Yersinia* spp. (54), UreR (47), ToxT (55), and, more recently, HilC and HilD (31). The two HTH motifs at the C terminus of these proteins seem to make contact with two adjacent major groove regions along one face of the DNA helix (26, 36). However, it is still not clear whether these proteins act as monomers or dimers.

Considering the important role of PerA in EPEC pathogenesis, in this work, we have determined the PerA-binding sequence of *bfpA* and *perA* by analyzing protein-DNA interactions and thus have proposed a consensus motif. An additional binding sequence was identified within the *bfpA* structural gene, which was not required for *bfpA* activation. In addition, the analysis of protein-protein interactions generated evidence that PerA acts as a monomer to activate the transcription of the *bfpA* and the *perA* promoters.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and growth conditions.** The strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Overnight cultures were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth medium (38). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 0.45% (w/vol) glucose and L-glutamine (584 mg/liter), without sodium pyruvate (Gibco Life Technologies), and supplemented with pyridoxal (4 μg/ml), was used for growth at 37°C. When necessary, antibiotics were added at the following concentrations: ampicillin, 100 μg/ml; kanamycin, 30 μg/ml; gentamicin, 5 μg/ml; tetracycline, 15 μg/ml; chloramphenicol, 30 μg/ml; and streptomycin, 100 μg/ml.

**Molecular biology techniques.** DNA manipulations were performed according to standard protocols (38). Restriction and DNA-modifying enzymes were obtained from Roche, New England Biolabs, or Gibco BRL and used according to the manufacturer's instructions. Radiolabeled nucleotides [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP at 3,000 Ci/mmol (7) were purchased from Amersham Corp. Oligonucleotides were purchased from BioSynthesis or provided by the Oligonucleotide Synthesis Facility at Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Mexico. The sequences of all oligonucleotides not reported here are available upon request. PCRs were performed in volumes of 100 or 50 μl with Taq Gold polymerase (Perkin-Elmer) according to the manufacturer's instructions. Double-stranded DNA sequencing of the plasmids generated in this work was carried out by the dideoxy-chain termination procedure with a Thermo Sequenase cycle sequencing kit according to the manufacturer's instructions (Amersham, Inc.).

**Expression and purification of MBP-PerA.** Expression and purification of the maltose-binding protein (MBP)-PerA fusion were conducted as described previously (26). Briefly, the PerA expression plasmid pMAL-T2 was constructed by amplifying the *perA* gene from plasmid pCST with Taq Gold polymerase and cloned in frame at the 3' end of the *malE* gene in pMALC2xa (New England Biolabs) by using the *Bam*HI and *Pst*I sites. Strain BL21/pLys7 transformed with pMAL-T2 was grown in LB medium with 0.2% glucose and 100 μg of ampicillin per ml at 30°C in an agitated water bath. The expression of MBP-PerA was induced by addition of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to 0.3 mM when the culture reached an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.5 to 0.7, and then the culture was incubated for another 3 h. The bacterial cells 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 sonicated at 4°C by five 30-s pulses with 30-s resting cycles. Crude extract was obtained by centrifugation at 14,000 × g for 30 min at 4°C.

MBP-PerA was bound to an amylose column equilibrated with column buffer at room temperature and eluted with the same buffer supplemented with 10 mM maltose. The concentration of the purified protein was determined by the method of Bradford and analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (10% polyacrylamide).

**Antibodies.** Rabbit polyclonal antibodies against a synthetic peptide (PerA-COOH) with the sequence NH<sub>2</sub>-GCKKNGVYSITGTLT-COOH, corresponding to the last 15 amino acids of the carboxy terminus of PerA (positions

AQ: A

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

260 to 274) plus a glycine and cysteine that were added at the N-termini to improve the cross-linking reaction, were produced as follows. Peptide PerA-COOH was coupled to bovine serum albumin (BSA) by dialyzed cross-linking with SPDP (N-succinimidyl 3-[2-pyridyldithio] propionate) (Pierce), as described by Alagón and King (1). New Zealand rabbits were immunized weekly with 200 µg of the BSA-peptide complex. After 13 weeks, the rabbits were bled, and the titers of antibody specific for the peptide were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot analysis demonstrated that the antipeptide antibodies were able to specifically recognize the full PerA protein. Anti-MBP and anti-LexA antibodies were purchased from New England Biolabs and Invitrogen, respectively. Anti-BfpA antibodies were kindly provided by Jorge Girón.

AQ: B

**Adherence assay.** Adherence assays were performed as described previously (35). Briefly, bacteria were grown overnight in LB medium at 37°C with agitation. The next day, 5 ml of fresh DMEM supplemented with 1% LB medium was inoculated with a 1/50 dilution of the LB medium overnight and incubated at 37°C for 2 to 3 h (to an OD<sub>600</sub> of approximately 0.6 to 0.8). Cell monolayers of HeLa cells, grown in DMEM on glass coverslips in a 24-well microplate (Costar), were infected with 100 µl of the bacterial culture and incubated at 37°C on a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 3 h. Unattached bacteria were removed by being washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) solution, fixed with cold methanol, stained with Giemsa, observed under an optical microscope (Nikon), and photographed.

**Western blotting.** Overnight bacterial cultures in LB medium were subcultured into DMEM and incubated in a gitated water bath at 37°C to an A<sub>600</sub> of 1.0. One milliliter of each bacterial suspension was pelleted and resuspended in Laemmli buffer. Samples were boiled, subjected to SDS-PAGE (10% polyacrylamide), and transferred to 0.22-µm-pore-size nitrocellulose membranes (Amersham, United Kingdom). Membranes were blocked with 5% nonfat milk and incubated with anti-BfpA, anti-PerA, anti-LexA, or anti-MBP antibodies. Membranes were washed with Tris-buffered saline (TBS)-0.05% Tween 20, immunostained with a 1:10,000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (Biomeda), and developed with Chemiluminescence reagents according to the manufacturer (Alpha Innotech). Bands were detected with an Alpha-Imager imaging system. Native polyacrylamide gels were transferred in a semidry electrophoresis unit (Bio-Rad) to 0.22-µm-pore-diameter nitrocellulose membranes according to the manufacturer's instructions and processed as described above.

**EMSA.** Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were carried out as follows. PCR-amplified DNA fragments were incubated in binding buffer (25 mM HEPES [pH 7.9], 40 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol [DTT], 0.1 mM EDTA, 5% glycerol) with different concentrations of MBP-PerA in a final volume of 20 to 25 µl at room temperature for 20 min. Samples were loaded onto 0.25 × Tris-borate-EDTA (TBE)-2.5% agarose or native 6% acrylamide gels and run at 120 V at room temperature. Gels were stained with ethidium bromide and visualized with an Alpha-imager UV transilluminator (Alpha Innotech).

**Double-stranded oligonucleotide shift assays** were performed as previously described (39). Briefly, 100 ng of each primer was 5' end labeled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dATP and T4 polynucleotide kinase (Amersham). The same amount of the corresponding complementary oligonucleotide was annealed to its radioactive partner by boiling them together and slowly cooling to room temperature. Double-stranded molecules were purified with Centricon filters (Millipore), and radioactive counts were determined with a Beckman counter. EMSAs were carried out as described above, except that samples were loaded onto a 6% native polyacrylamide gel and run at room temperature with TGE buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.5], 384 mM glycine, 2 mM EDTA) at 300 V (37). Gels were vacuum dried and exposed in a PhosphorImager and/or exposed to X-ray films.

**DNase I protection assay.** DNase I protection assays were done as described in references 26 and 32. PCR fragments carrying residues -201 to +26 of *bfpA* and -155 to +81 of *perA* were <sup>32</sup>P labeled on the 5' end of the bottom strand. About 100,000 cpm of the probes was preincubated at room temperature with increasing concentrations of MBP-PerA in the same binding buffer used for EMSAs. After 20 min, DNase I (0.003 U) (Roche) in dilution buffer (8 mM Tris-HCl [pH 7.9], 40 mM MgSO<sub>4</sub>, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 40 mM KCl, 2 mM EDTA [pH 8.0], 24% glycerol) was added to the mixture, which was incubated at room temperature for 2 min. The reaction was quenched by adding 300 µl of stop solution (570 mM ammonium acetate, 80% ethanol, 50 µg of carrier tRNA per ml). The DNA was precipitated, dried, and suspended in 8 µl of stop/loading buffer (45 mM Tris-borate [pH 8.0], 1 mM EDTA, 80% formamide). Samples were denatured at 85°C for 5 min and resolved by electrophoresis through an 8% polyacrylamide sequencing gel. Gels were vacuum dried and exposed to X-ray films or visualized with a PhosphorImager (Molecular Dynamics). Sequencing

reactions performed with the primer corresponding to the 5' end of the foot-printing fragments were included as size markers.

**Construction of the LexA-PerA fusion for protein-protein interaction assays.** The LexA-based genetic system used here to monitor protein-protein interactions in an *E. coli* background was described previously (7, 8). The PerA gene was PCR amplified with primers T-B2-190F and T-Kp1-R by using Taq Gold polymerase with plasmid pCST (Table 1) as a template. The resulting fragment was cloned in-frame as a BglII-KpnI fragment into the LexA DNA binding domain (DBD)-coding sequence in pSR660, generating plasmid pM1660-PerA. Plasmids pSR658-INS (V. H. Bustamante et al., unpublished results), pSR658-CAT (7), and pM1660-AraC (Table 1) were used as positive controls. These plasmids respectively encode LexA<sub>DBD</sub> fusion proteins to INS, an oligomeric nucleoid-associated protein involved in both transcription regulation and DNA compaction (52); to chloramphenicol acetyltransferase (CAT), a homotrimeric enzyme (7); and to AraC, a dimeric transcriptional regulator involved in arabinose catabolism that represents the prototype protein of the AraC family (13, 17, 43). These plasmids were introduced into *E. coli* SU101, which was used as the reporter strain to monitor the ability of the hybrid proteins to form functional LexA<sub>DBD</sub> dimers, with the capacity to repress the expression of a chromosomal *uidA::lacZ* fusion (8). Strains were grown overnight in LB medium plus 15 µg of tetracycline per ml at 37°C and subcultured the next day in LB medium supplemented with 1 mM IPTG. Samples were collected at OD<sub>600</sub> of 0.6, 0.8, 1.0, and 1.2 and used for  $\beta$ -galactosidase assays as described before (32).

**CAT assay.** The CAT assay was performed as previously described (6, 35).

## RESULTS

**Purification of PerA.** We have previously shown that expression of both *bfpA* and *perA* requires the PerA protein and a 40-bp-long AT-rich motif that is located upstream of their respective promoters (5, 23). To precisely define the PerA binding sites in the *bfpA* and *perA* promoters, PerA was fused to the MBP to facilitate its purification, by cloning the *perA* gene into pMALC2xa, generating pMAL-T2 (see Materials and Methods). This strategy has been used successfully for the purification of other AraC-like proteins, such as Rns and ExxA, involved in the regulation of virulence determinants in other bacteria (18, 26). Upon IPTG induction in *E. coli* BL21/pMAL-T2, the protein was purified throughout an amylose resin column, and two bands were observed in the eluted fractions (Fig. 1A). According to its apparent molecular mass, the first band, of approximately 71 kDa, corresponded to the full fusion protein, while the second, of ca. 51 kDa, corresponded to a truncated product that contains MBP and a portion of the N-terminus domain of PerA. The integrity of the MBP-PerA fusion protein in the first band was corroborated by Western blot analysis with rabbit polyclonal antibodies directed against the last 15 residues of the C-terminal sequence of PerA (Fig. 1B). These antibodies only recognized the upper band, indicating that the entire PerA sequence is expressed at the C terminus of the MBP. In contrast, the short band corresponded to a truncated version of the fusion, which was recognized only by anti-MBP antibodies (data not shown). This product was also generated in other *E. coli* strains, including EPEC and *E. coli* strains carrying mutations in major proteases such as Lon and ClpP (51), and in the presence of three protein inhibitors during the purification process (data not shown). Whether this processing is an artifact due to protein overexpression or to posttranscriptional events that control PerA levels in the cell is under investigation.

Cleavage with protease factor Xa generated two bands: one corresponding to MBP and the other corresponding to PerA, as tested by Western blotting with anti-MBP and anti-PerA antibodies (data not shown). However, the band corresponding

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

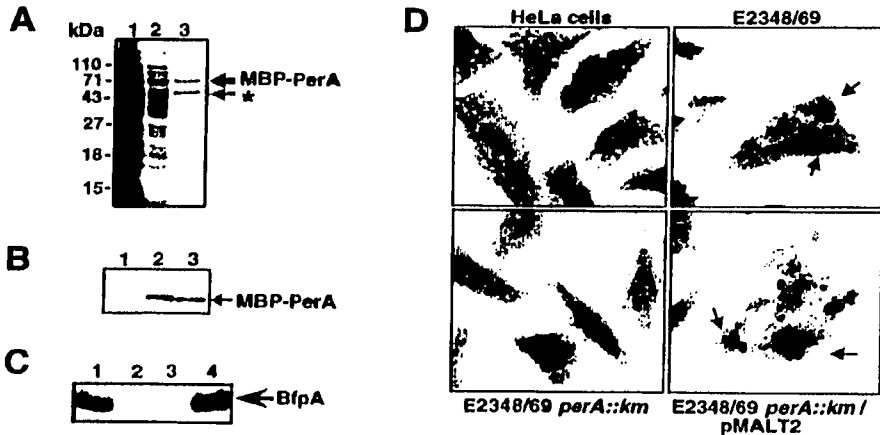


FIG. 1. Purification and characterization of the MBP-PerA fusion. (A) PAGE of samples corresponding to different steps of the purification process. Lanes: 1, IPTG-induced cells; 2, crude extract after sonication and centrifugation; and 3, amylose column-purified protein. (B) Detection of MBP-PerA fusion by Western blotting with anti-PerA polyclonal antibodies. Lanes: 1, noninduced cells; 2, crude extract of IPTG-induced cells after sonication and centrifugation; 3, amylose column-purified protein. (C) Complementation of an EPEC E2348/69 *perA::Km* mutant with plasmid pMALT2 encoding MBP-PerA. Shown are Western blotting results with anti-BfpA antibodies. Lanes: 1, EPEC E2348/69; 2, JPN15; 3, *perA::Km*; 4, *perA::Km/pMALT2*. (D) LA assay on HeLa cells.

to PerA was highly insoluble and unstable upon purification. Previous attempts to purify PerA by other strategies were unsuccessful, mainly due to its high insolubility, a characteristic shared by other AraC-like proteins (13). The purified MBP-PerA protein was soluble and stable upon storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

The ability of the recombinant MBP-PerA protein to correctly activate *bfpA* expression was tested in EPEC strain E2348/69 *perA::Km*, a strain lacking a functional *perA* gene (Table 1). First, the expression of BfpA, the structural component of EPEC strains E2348/69 wt, E2348/69 *perA::Km*, JPN15 (a strain lacking the EAF plasmid), and E2348/69 *perA::Km/pMAL-T2*. As shown in Fig. 1C, plasmid pMAL-T2 was able to complement the *perA* mutant for expression of BfpA. Moreover, an adherence assay on Hep-2 cells demonstrated that MBP-PerA was also able to restore the LA phenotype in the *perA* mutant strain (Fig. 1D).

Furthermore, the DNA binding activity of the purified MBP-PerA was evaluated by EMSA (Fig. 2) with PCR products containing the *bfpA* (positions  $-214$  to  $-15$ ) and *perA* (positions  $-155$  to  $+21$ ) upstream regions that were previously shown to be essential for the PerA-dependent activation of both genes (5, 23). In both cases, DNA-protein complexes were formed at MBP-PerA concentrations of  $4.3 \mu\text{g}$  ( $3 \mu\text{M}$ ), indicating that the purified protein also maintained its DNA binding activity in vitro (Fig. 2). In addition, Western blot analysis of the shifted products with anti-PerA antibodies demonstrated that MBP-PerA was bound to the fragment. These complexes were further shifted when anti-PerA antibodies were included in the binding reaction (data not shown). These results demonstrated that MBP-PerA is functional and is appropriate for further in vitro studies.

**Mapping of PerA binding sites.** In order to delimit the PerA binding motif on the *bfpA* regulatory region, EMSAs were performed with overlapping 200-bp-long PCR fragments that span upstream and downstream *bfpA* sequence from positions  $-374$  to  $+262$  with respect to the transcription start point (Fig.

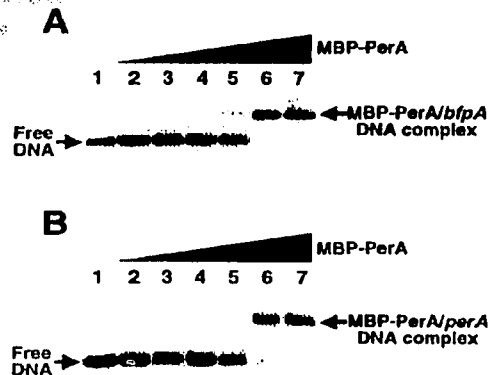


FIG. 2. Binding of MBP-PerA to *bfpA* and *perA*. EMSAs with a *bfpA* fragment from positions  $-214$  to  $-15$  (A) and a *perA* fragment from positions  $-155$  to  $+21$  (B) were carried out with 0, 0.11, 0.21, 0.43, 0.87, 2.16, and  $4.3 \mu\text{g}$  (0, 74 nM, 148 nM, 298 nM, 596 nM, 1.5  $\mu\text{M}$ , and 3  $\mu\text{M}$ , respectively) of purified MBP-PerA (lanes 1 to 7). Samples were resolved in 2.5% agarose gels, stained with ethidium bromide, and photographed with an Alpha Imager.

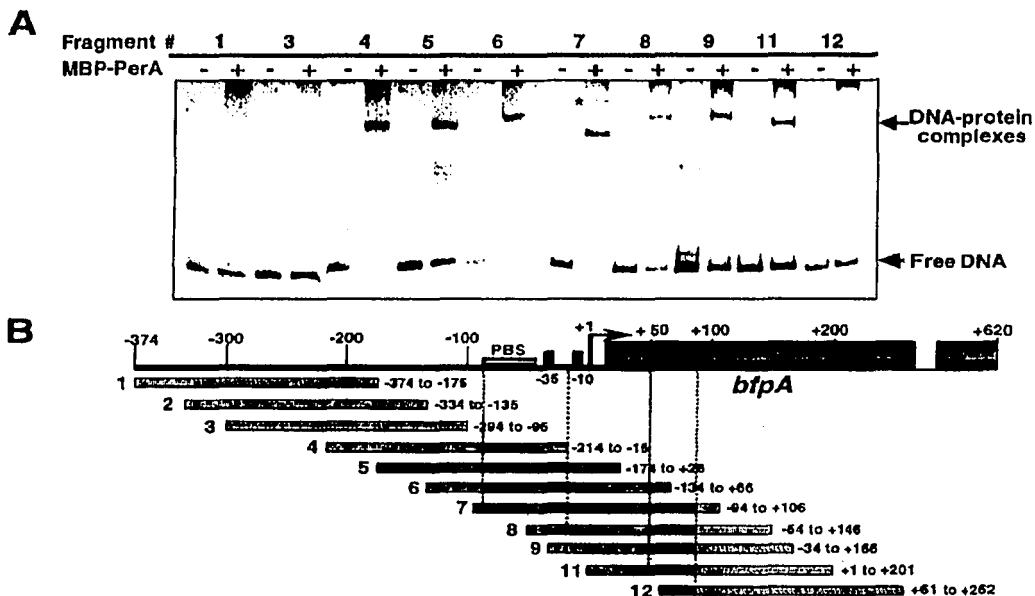


FIG. 3. Mapping of the PerA binding site on the *bfpA* regulatory region by EMSA. (A) Overlapping 200-bp-long PCR fragments that span the *bfpA* upstream and downstream promoter region from positions -374 to +262 were incubated with (+) or without (-) 2.16  $\mu$ g (1.5  $\mu$ M) of purified MBP-PerA. Samples were resolved in 6% native polyacrylamide gels and visualized by ethidium bromide staining. The asterisk denotes the second complex formed with fragment 7. (B) Schematic representation of the PCR fragments spanning the *bfpA* regulatory and structural regions. The fragment number is indicated to the left, and the sequence range covered for each fragment is indicated to the right. The approximate locations of the putative PerA binding sites, upstream and downstream of the *bfpA* promoter, are indicated by black and gray boxes, respectively. PBS, previously proposed PerA binding sequence

3). About 2.2  $\mu$ g of purified MBP-PerA was mixed with approximately 50 ng of each PCR product, and the reaction mixtures were subjected to electrophoresis in 6% native polyacrylamide gels. In these experiments, fragments 4 to 11 formed one major shifted DNA-protein complex, with the interesting exception of fragment 7 (positions -94 to +106), which formed two complexes showing a distinctive mobility pattern (Fig. 3). Fragments 4 to 7 contained the previously proposed PerA binding sequence (5) and thus were expected to be shifted by PerA. However, fragments 8 to 11 were unexpectedly shifted, producing a complex similar to that observed for fragments containing the PerA binding sequence (Fig. 3A) (see below). The pattern observed for fragment 7 and the complex formed by MBP-PerA with fragments 8 to 11, suggested that a second binding site was present between the transcriptional start point and position +106 (Fig. 3B). In contrast, fragments 1 to 3 and 12, which do not contain a putative or full-length PerA-binding sequence, were not bound by MBP-PerA, a result that also supported the specificity of MBP-PerA binding to fragments containing a binding site.

Similar experiments with fragments spanning the *perA* sequence from positions -161 to +425 allowed us to delimit the putative PerA binding sequence within the region previously

proposed to contain this sequence motif (23) and to suggest the presence of a second PerA binding site located in the *perA* structural sequence downstream of position +180 (data not shown).

**Analysis of PerA binding to mutant *bfpA* regulatory sequences.** We have previously reported that a single nucleotide deletion or insertion at different positions upstream from the promoter, but within the region needed for PerA-dependent activation, decreased *bfpA* expression to less than 2% (5). In order to define whether these mutations affected PerA affinity for its binding site, EMSAs were performed with 200-bp PCR fragments carrying either a single deletion or insertion at the 10-A tract between positions -65 and -74. Retardation of these fragments was equivalent to that observed for the wild-type sequence (data not shown), supporting the hypothesis that single insertions or deletions do not affect binding, but rather disrupt the correct orientation and alignment between the PerA binding site and the promoter, probably affecting PerA-RNA polymerase interactions (5).

**DNase I footprinting analysis.** To determine more precisely the sequence recognized by PerA on both promoters, DNase I protection assays (Fig. 4) were performed with radiolabeled fragments that included the putative PerA binding sequences

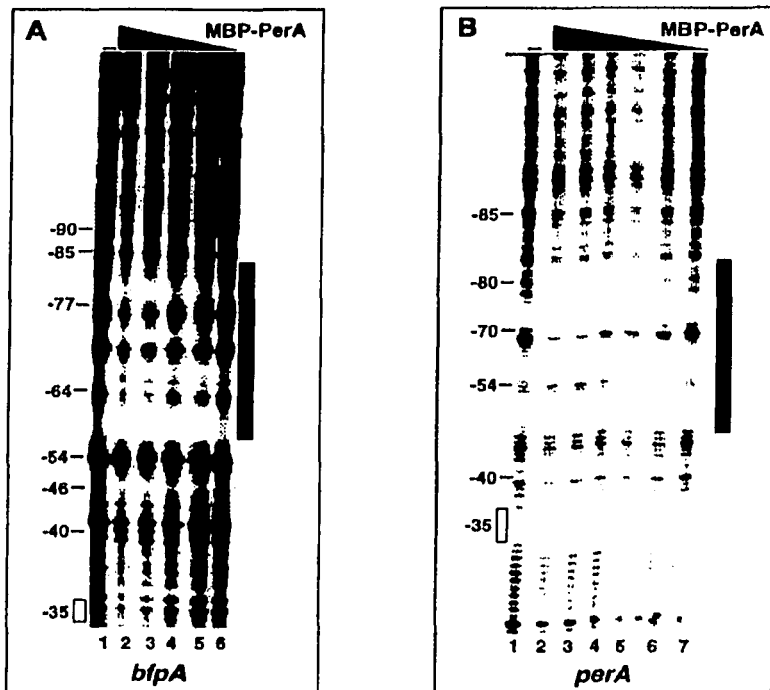


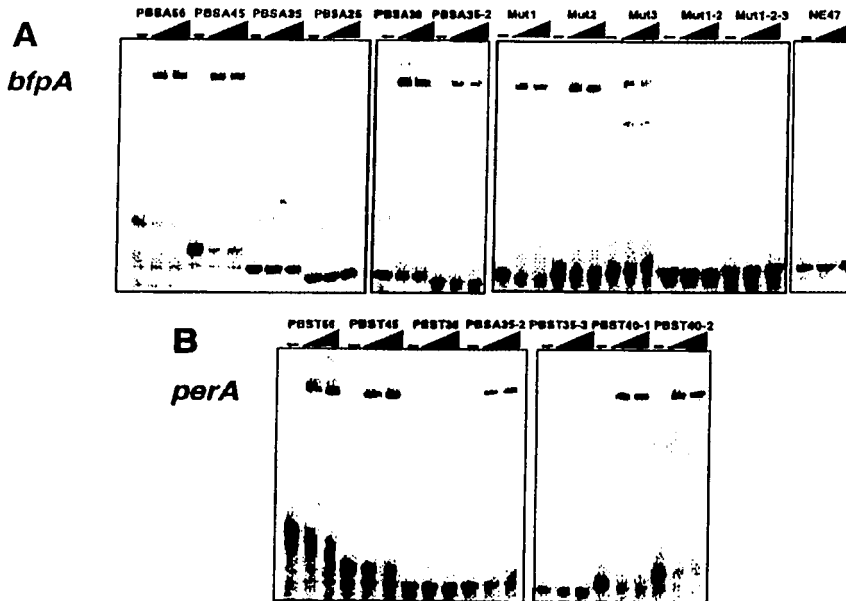
FIG. 4. DNase I protection of the *bfpA* (A) and *perA* (B) regulatory regions by MBP-PerA. Increasing amounts of MBP-PerA were mixed with 100,000 cpm of a  $^{32}\text{P}$ -end-labeled DNA fragment corresponding to positions -201 to +26 of *bfpA* and -155 to +81 of *perA* and treated with 0.003 U of DNase I. Samples were subjected to electrophoresis on an 8% polyacrylamide sequencing gel. The -35 promoter sequence and other upstream positions are indicated on the left; they were determined by running in parallel sequencing reactions with the same fragments (data not shown). The protected regions are indicated by vertical black bars. The black triangles above the gels represent increasing amounts of MBP-PerA. (A) Lanes: 1, DNA alone; 2 to 6, 159 nM, 316 nM, 634 nM, 1.26  $\mu\text{M}$ , and 2.2  $\mu\text{M}$ , respectively. (B) Lanes: 1, DNA alone; 2 to 7, 37 nM, 74 nM, 148 nM, 295 nM, 753 nM, and 1.5  $\mu\text{M}$ , respectively.

described above and increasing amounts of MBP-PerA, in the range of 37 nM to 1.5  $\mu\text{M}$  for *perA* and 158 nM to 2.2  $\mu\text{M}$  for *bfpA*. MBP-PerA protected the sequence located between positions -83 and -56 in *bfpA* (Fig. 4A), which is consistent with the results described above and those described previously (5). For *perA*, the protected region, located approximately between positions -81 and -47 (Fig. 4B), included a sequence motif that was previously shown to be important for the PerA-dependent activation of *perA* (23). Part of this motif is located upstream from the homology region previously suggested to constitute the PerA binding site (5).

PerA binds to double-stranded oligonucleotides containing the putative PerA binding sites. To further characterize the PerA binding motifs, EMSAs were performed with double-stranded oligonucleotides of different lengths, which were designed according to the results described above (Fig. 5 and Tables 2 and 3).

MBP-PerA binding to a 45-bp DNA probe (PBSA45) (po-

sitions -90 to -46) (Fig. 5A) that contained the DNase I-protected region of the *bfpA* promoter resulted in the formation of a major retarded band. Most of the probe was retarded at an MBP-PerA concentration of 1.06  $\mu\text{M}$ . This binding was specifically competed by an excess of cold probe (not shown). In addition, a nonspecific probe was not shifted by the highest concentration of protein used in these experiments (Fig. 5A). An 11-bp extension, added to the 3' end to create the oligonucleotide PBSA56 (positions -90 to -35) (Table 2), did not significantly increase PerA binding for this site (Fig. 5A). In contrast, elimination of 10 bp at the 3' end of PBSA45 to create PBSA35 (positions -90 to -56) reduced PerA binding by about 81%, and a further 10-bp reduction at the 3' end to create PBSA25 (positions -90 to -66) abolished PerA binding (Table 2 and Fig. 5A). Similarly, a 27-bp probe, PBSA2/2 (positions -65 to -39), which contains 20 bp of the 3' end of the original PBSA45 plus an extension of 7 bp, did not show any binding (Table 2) (data not shown).



TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

FIG. 5. PerA binds to double-stranded oligonucleotides containing the putative PerA binding site. EMSAs were performed by incubating  $^{32}$ P-labeled double-stranded oligonucleotides of different lengths containing *bfpA* (A) or *perA* (B) sequences (as described in Tables 2 and 3, respectively), with 1.06 and 2.1  $\mu$ M MBP-PerA. Control reactions with DNA alone were included as controls. A nonspecific 47-mer oligonucleotide containing an unrelated sequence was included as a negative control. In addition, control reactions with 50- and 100-fold molar excesses of the unlabeled 45-mer (PBSA45) were included to demonstrate the specificity of the interaction (data not shown). Samples were subjected to electrophoresis on a 6% native polyacrylamide gel.

Elimination of 5' bases with respect to PBSA45 down to position -84 (probe PBSA39) did not affect binding significantly; however, a further 5' deletion down to position -80 (probe PBSA35-2) reduced binding by about 53% (Table 2 and Fig. 5A). These data suggested that PerA binds efficiently to a sequence located between positions -84 and -45 in the *bfpA* promoter and that around 39 to 45 bp is required for efficient binding in vitro.

We then tested the role in PerA binding of particular nucleotide positions, by designing probes carrying different modifications within the region that constitutes the binding site. Based on the sequence of PBSA45, positions -90 to -85, -84 to -79, -76 to -71, and -60 to -56 were substituted for with random sequences to create probes 5' Mut, Mut1, Mut2, and Mut3, respectively (Table 2). These changes reduced PerA binding by 25, 30, 18, and 57%, respectively (Table 2 and Fig. 5A). For probes in which changes in Mut1 and -2 (Mut1-2) or Mut1, -2, and -3 (Mut1-2-3) were combined, binding was reduced by about 79% or almost abolished (Table 2 and Fig. 5A), while a single point mutation at position -84 (PBSAmG84) or -64 (PBSAmG64) did not affect PerA binding (Table 2) (data not shown). Two nonspecific probes (NE34 and NE47) were used as negative controls for these assays, and for both cases,

no shifted band was observed (Table 2 and Fig. 5A) (data not shown).

Changes at the 5' end of the sequence (5' Mut, Mut1, and Mut2) only caused a moderate reduction in binding (Fig. 5A and Table 2), suggesting that these motifs are not essential but may contribute to create the appropriate structure for the efficient interaction between PerA and the DNA. However, the combination of these changes had a more dramatic effect on binding, especially when combined with the changes in the sequence motif modified in Mut3, which seems to play a more relevant role in PerA binding (Table 2). In this regard, we have previously shown that the elimination of the sequence motif modified in Mut1, in the context of a *bfpA-cat* transcriptional fusion (pCAT177), caused an 84% reduction in CAT activity with respect to a *bfpA-cat* fusion carrying a fragment up to position -85 (5). Likewise, single insertions or deletions that disrupt the appropriate orientation of these motifs between each other or between them and the promoter had dramatic effects by almost abolishing *bfpA* expression (5). Overall, these results indicate that PerA binds to a sequence located between positions -83 and -49 (Table 2), which shows some flexibility for in vitro binding. However, they also support the notion that the appropriate distribution of particular motifs allows the



TABLE 2. Binding to double-stranded oligonucleotides corresponding to the *bfpA* regulatory region\*

Probe	Sequence relative to <i>bfpA</i> promoter region								Relative shift (%) <sup>b</sup>
	-98	-90	-85	-77	-64	-54	-46	-40	
	GTACTCGCGGGACCGAAATATATAAAAAAAAAAGAAAAAAGATTATTTTTTTCTTGGTCC <b>TTGGCTGCTTT</b>								
PBSA56	GGGGACGGAAATATATAAAAAAAAAAGAAAAAAGATTATTTTTTTCTTGGTCC <b>T</b>								100
PBSA45	GGGGACGGAAATATATAAAAAAAAAAGAAAAAAGATTATTTTTTT								100
PBSA35	GGGGACGGAAATATATAAAAAAAAAAGAAAAAAG								19
PBSA25	GGGGACGGAAATATATAAAAAAAAA								<1
PBSA2/2	<b>ACAAAAAAGATTATTTTTTTCTTGG</b>								0
PBSA39	GGAAATATATAAAAAAAAAAGAAAAAAGATTATTTTTTT								100
PBSA35-2	ATATAAAAAAAAAAGAAAAAAGATTATTTTTTT								47
Mut1	GGGGAC <b>ACCCG</b> ATATAAAAAAAAAAGAAAAAAGATTATTTTTTT								70
Mut2	GGGGACGGAAATAT <b>CGCC</b> AAAAAAGAAAAAAGATTATTTTTTT								82
Mut3	GGGGACGGAAATATATAAAAAAAAAAG <b>AGCC</b> CAATTATTTTTTT								43
Mut1-2	GGGGAC <b>ACCCG</b> AT <b>CGCC</b> AAAAAAGAAAAAAGATTATTTTTTT								21
Mut1-2-3	GGGGAC <b>ACCCG</b> AT <b>CGCC</b> AAAAAAG <b>AGCC</b> CAATTATTTTTTT								<1
S'Mut	TCTTCTGGAAATATATAAAAAAAAAAGAAAAAAGATTATTTTTTT								75
PBSAmG64	GGGGACGGAAATATATAAAAAAAAAAGAAAAAAGATTATTTTTTT								100
PBSAmG84	GGGGACGGAAATATATAAAAAAAAAAGAAAAAAGATTATTTTTTT								100
PBSA2-56 <sup>c</sup>	TTATGGTTCTATAAATCATGAATAAGAAATACAAAAAGGTCTGTCTTTGATTGAA								53 <sup>d</sup>
NE34 <sup>e</sup>	TCGAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTGACTCTCGAG								<1
NE47 <sup>f</sup>	GATCAGTCCCTGAATGGTGTGAAGTAAAGTCCCTCAAGAATCCC								4

\* Modified sequences are underlined. The boldface letters indicate the location of the minimal sequence required for PerA binding.

<sup>b</sup> Estimated by EMSA relative to PBSA45.

<sup>c</sup> Sequence corresponding to positions +38 to +93 of *bfpA*.

<sup>d</sup> Relative to PBSA56.

<sup>e</sup> Random sequences.

establishment of functional protein-DNA interactions that permit the transcriptional activation of this promoter.

Similar experiments were performed with double-stranded oligonucleotides containing the putative PerA binding site identified for *perA*. A 45-bp probe (PBST45) (Table 3) that spans positions -84 to -40 was retarded at an MBP-PerA concentration of 2.64  $\mu$ M, which was slightly more efficient than the retardation shown at the same concentration for PBSA45 (data not shown). As for the binding site in *bfpA*, a *perA* probe with a 3' extension down to position -30 (PBST56) (Table 3), did not significantly increase PerA binding. In contrast, binding of a 35-bp probe (PBST35), lacking 10 bp at the 3' end with respect to the sequence of PBST45 (positions -84 to -50), was severely reduced (Table 3 and Fig. 5B). Furthermore, 40-bp-long probes carrying positions -79 to -40 (PBST40-1) and -75 to -36 (PBST40-2), which still included the DNase I-protected region, were efficiently retarded by PerA (Table 3 and Fig. 5B), while binding to a 35-bp probe (PBST35-2) lacking 5' positions -84 to -75 was reduced by

50% (Table 3 and Fig. 5B). Finally, a 35-bp probe (PBST35-3) containing slightly more than the 3' half of the site (positions -64 to -30) was not bound by the protein (Table 3 and Fig. 5B). These results demonstrated the relevance of the sequence located between positions -75 and -40 for PerA binding and are also in agreement with a deletion analysis showing that a deletion down to position -66 almost abolished the expression of a *perA-cat* fusion (23).

As for other AraC-like proteins, here we have shown that, in order to activate transcription, PerA binds to AT-rich regions of about 40 bp located between positions -84 and -46 at the *bfpA* promoter and between -75 and -40 at the *perA* promoter. The comparison of these two motifs allows us to propose a consensus PerA DNA binding sequence and a revised sequence alignment between the *bfpA* and *perA* regulatory regions (Fig. 6). Although they share an AT-rich composition, the consensus PerA DNA binding sequence does not have homology with the consensus sequences proposed for other

TABLE 3. Relative binding to double-stranded oligonucleotides corresponding to the *perA* regulatory region\*

Probe	Sequence relative to <i>perA</i> promoter region					Relative shift (%) <sup>b</sup>
	-81	-75	-66	-54	-40	
	CAACACCTTGAAAAATATCAGTAAATTTTTAAAAAAAAAAGCATAAAAGTATTGATTACAGAG					
PBST56	CAACACCTTGAAAAATATCAGTAAATTTTTAAAAAAAAAAGCATAAAAGTATTGATT					100
PBST45	CAACACCTTGAAAAATATCAGTAAATTTTTAAAAAAAAAAGCATAA					100
PBST35	CAACACCTTGAAAAATATCAGTAAATTTTTAAAAA					8
PBST40-1	CCTTGAAAAATATCAGTAAATTTTTAAAAAAAAAAGCATAA					100
PBST35-2	AAAAATATCAGTAAATTTTTAAAAAAAAAAGCATAA					50
PBST40-2	GAAAAATATCAGTAAATTTTTAAAAAAAAAAGCATAAAAGT					100
PBST35-3	GTAATTTTTAAAAAAAAAAGCATAAAAGTATTGATT					0

\* Modified sequences are underlined. The boldface letters indicate the location of the minimal sequence required for PerA binding.

<sup>b</sup> Estimated by EMSA relative to PBST45.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Although neither the role nor the mechanism for PerA binding at a second site was elucidated in this study, we cannot rule out the possibility that such a site has a function under specific conditions. Additional binding sites, downstream of the transcriptional start site, have been described for other AraC-like regulators involved in the regulation of virulence factors (25). For Rns, one of the additional sites located within the *rns* structural gene was essential for the Rns-dependent activation of its own promoter (27).

PerA does not form dimers as a functional LexA-PerA fusion protein. It is not known whether the active form of AraC family members that regulate virulence factors is a dimer or a monomer. Dimerization has been shown to be important for the activity of AraC family members that regulate transcription in response to a chemical signal such as AraC, which is active in the presence of arabinose (20, 43), or UreR, which is active in the presence of urea (33). Dimerization has also been suggested based on genetic evidence for Rns-like proteins such as Rns (26), VirF of *Shigella flexneri* (34), and ToxT of *V. cholerae* (19). The dimerization capacity of AraC and UreR correlates with the presence of critical leucines that are part of predictable coiled-coil domains at the amino-terminus domain. A coiled-coil domain is a primary structural element in proteins that mediates homo- or hetero-oligomeric interactions (21). Analysis of the PerA sequence with different programs that allow the prediction of potential coiled-coil domains did not reveal the presence of any predictable dimerization domain at its N terminus (data not shown), suggesting that PerA did not have the capacity to form dimers. The apparent lack of symmetry of the sequence motifs required for PerA binding (Fig. 6) further suggested that PerA binds as a monomer instead of as a dimer.

In order to assess PerA dimerization, a LexA-based genetic system was used to evaluate potential protein-protein interactions between monomers of PerA. As positive controls, the N-terminal DBD of LexA was fused to the full-length sequences of various proteins, whose dimerization or oligomerization capacity had been tested before. H-NS and AraC are two transcriptional regulatory proteins in which the active form that binds to DNA and regulates transcription is an oligomer or a dimer (22, 52), and CAT is a homotrimeric enzyme previously used as a positive control in this assay (7). The full-length PerA protein was also fused in frame to the distal part of the LexA DBD, creating plasmid pMI660PerA (Table 1). This plasmid was first transformed into an EPEC E2348/69 *perA*-negative strain to determine if the LexA-PerA hybrid protein still retained the transcriptional activator properties of wild-type PerA. The hybrid protein restored the expression of BfpA, as observed by Western blotting and the development of the LA phenotype (data not shown), indicating that PerA was still functional when fused to the LexA DBD.

The H-NS, CAT, and AraC control hybrid proteins, which were expected to form functional LexA dimers due to their capacity to oligomerize, repressed the expression of a *sulA::lacZ* fusion in the *E. coli* reporter strain SU101 (Fig. 8). The repressor activity of the LexA-AraC fusion protein demonstrated that this assay was useful to assess the dimerization capabilities of proteins belonging to this family of transcriptional activators. In contrast, the LexA-PerA hybrid did not

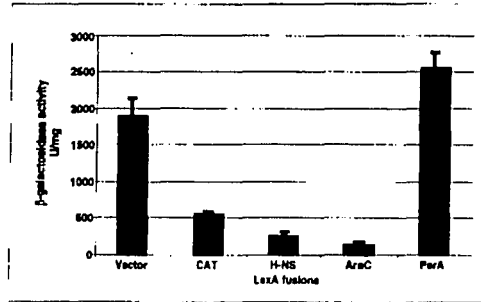


FIG. 8. A LexA-PerA fusion does not form dimers. The ability of the full-length PerA protein fused to the LexA DBD to dimerize was evaluated by measuring the activity of a *sulA::lacZ* fusion in *E. coli* SU101. The  $\beta$ -galactosidase activity was determined from samples obtained from bacterial cultures grown on LB medium supplemented with 1 mM IPTG at an  $OD_{600}$  of 0.8. The LexA-AraC, LexA-H-NS, and LexA-CAT fusions were used as positive controls. The results are the average of three different experiments.

show any repressor activity, strongly suggesting that PerA does not dimerize (Fig. 8).

## DISCUSSION

PerA plays a critical role in the regulation of virulence gene expression in EPEC (14, 23, 24, 49). Its essential role has been supported by the observation that a functional *perA* gene was required for full virulence in human volunteers (3) in addition to its high degree of conservation in different clinical isolates belonging to classical EPEC serotypes associated with human infections (30).

Despite its proposed pleiotropic role in the regulation of virulence gene expression in EPEC, the transcriptional activation of only two promoter regions, *bfpA* and *perA*, has been shown to be completely dependent on PerA (5, 23, 35, 49). In contrast, its role in the activation of other virulence genes, such as *ler* or *trcA*, seems to be modulatory, because the absence of PerA in an EPEC background has only a mild effect on their expression (6, 24, 50).

As for other AraC-like proteins involved in the regulation of virulence factors, the biochemical characterization of PerA has been hampered by difficulties in purifying a soluble protein (13). In some cases, this obstacle has been overcome by purifying a chimeric protein in which the AraC homologue is fused to a protein or peptide that facilitates its purification and increases its solubility and stability (26, 31, 55). In this study, we have been able to analyze the DNA binding properties of PerA by using a purified MBP-PerA fusion that retains the transcriptional activator features of wild-type PerA in vivo and shows DNA binding activity in vitro (Fig. 1 and 2).

MBP-PerA shifted PCR fragments containing the minimal sequence previously shown to be required for the PerA-dependent activation of *bfpA*, the gene encoding the BFP structural subunit and the first part of the *bfp* operon, as well as that of its own gene, previously shown to be autoregulated (5, 23).

PerA protected sites between positions -83 and -56 in *bfpA* and -81 and -47 in *perA*. Double-stranded oligonucleotides of different lengths, spanning the protected sequences, were used in EMSAs to determine the minimal sequence required by PerA for efficient DNA binding in vitro. For both promoters, around 40 bp was required for efficient shifting. The nucleotide alignment of the defined minimal sequences allowed the proposal of a consensus PerA binding motif, which consisted of an AT-rich 29-bp-long sequence in which 19 positions were identical between the two promoters (Fig. 6). AraC-like proteins recognize sequence motifs that range from 17 to 60 bp. MarA, Rob, and SoxS, three AraC-like proteins involved in stress response, interact as monomers with a 17- to 19-bp-long motif in two adjacent segments of the major groove (16, 36). AraC binds two 17-bp-long inverted repeats that are separated by 6 bp (17). Similarly, XylS, MelR, and RhaS have been shown to bind sequences between 33 to 56 bp that generally include two binding sites separated by a variable number of bases (2, 4, 15, 46). The binding site for Rns and related virulence gene regulators, such as VirF<sub>sr</sub>, CfaR, and AggR, is contained in an AT-rich 30-bp-long sequence (25, 26). Despite the sequence similarities at the HTH motifs between PerA and other virulence regulators, such as Rns, VirF, or ToxT, no clear sequence similarity was found between the PerA binding site and the binding sites described for these proteins (19, 26, 27, 54, 55). This offers an explanation for why PerA was not able to substitute for Rns to activate the *coo* and *ms* promoters and why Rns could not substitute for PerA to activate the *perA* promoter (25).

In *perA*, the PerA binding motif is located about one helix turn upstream from the -35 promoter sequence, while in *bfpA* it is located about two helix turns upstream from the promoter (Fig. 6). The functional significance of this distribution for the activation of both promoters is being further analyzed in the context of potential interactions between PerA and RNA polymerase or additional regulatory proteins. In this regard, we have recently observed that *bfpA* is not expressed in the absence of IHF (Y. Martínez-Laguna et al., unpublished observations), a global regulatory protein that has also been involved in the positive regulation of *ler* expression (12).

The lack of apparent symmetry in the sequence motif bound by PerA and the observation that it forms one major DNA-protein complex by EMSA suggested that it acts as a monomer and not as a dimer, as has been shown for other AraC-like proteins (13). This possibility was tested with a LexA-based hybrid bacterial system that allows the monitoring of protein-protein interactions (7, 8). In order to further corroborate the functionality of the assay, two DNA binding proteins, H-NS and AraC, and an enzyme, CAT, were used as positive controls because their dimerization or multimerization properties have been well documented (7, 17, 52). In all three cases, the hybrid proteins allowed the formation of functional LexA dimers that inhibited the expression of the *salA::lacZ* reporter fusion. In particular, the result obtained with the LexA-AraC fusion demonstrated that the LexA-based system is useful to evaluate the dimerization or multimerization properties of other members of the AraC family of transcriptional activators (Fig. 8). In contrast, a LexA-PerA fusion that still conserved the ability to activate *bfpA* transcription and BFP production in an EPEC *perA* mutant strain (data not shown) was unable to repress the

reporter fusion, strongly suggesting that PerA does not form dimers. Furthermore, expression of the N-terminal domain of PerA from an inducible promoter did not exert a dominant-negative effect on the expression of the *bfpA-cat* fusion or on the expression of the BfpA subunit in wild-type EPEC, as evaluated by CAT assays and Western blotting (data not shown). This observation supports the notion that PerA does not form dimers to activate transcription.

Based on these results, it is likely that PerA binds to its target sequences upstream of the *bfpA* and *perA* promoters as a monomer, probably following the interaction model based on the crystal structure of MarA bound to its target DNA (36), which has been also proposed for Rns (26). In this model, both HTH motifs form specific interactions with two adjacent segments of the major groove along one face of the DNA helix, via nonidentical nucleotide contacts. Dimerization of AraC-like proteins involved in virulence gene control has been proposed: for example, for VirF and ToxT, based on dominant-negative phenotypes observed with mutants that cannot bind DNA (19, 34). At this point, we cannot rule out the possibility that PerA dimerizes upon binding to its target DNA sequence, a mechanism that has been proposed for MelR (4).

The HTH2 motif is the region with the highest similarity between the AraC-like proteins and a consensus sequence derived from the alignment of more than 100 proteins, constituting the AraC family signature (13). The high degree of conservation of this motif has been used as an argument to propose that its function is common for all the AraC-like proteins, which is likely to involve interactions with RNA polymerase. In this regard, we have previously observed that the insertion or deletion of a single nucleotide between the *bfpA* promoter and the putative PerA binding site abolished *bfpA* transcription. This suggested that changes in the orientation of the binding site and the promoter affect the proper presentation of a critical protein surface that allows PerA-RNA polymerase interactions that are important to promote transcriptional activation (5). These insertions or deletions did not reduce the affinity of PerA for PCR fragments containing these modifications (data not shown), further supporting the notion that they rather disrupt the appropriate contacts between PerA and RNA polymerase.

In the case of AraC, binding of a sugar effector molecule (arabinose) to the N-terminus domain of the protein induces a structural change that produces the activator form of the AraC dimer (29, 40, 43). For other members of the family, binding of different molecules, such as rhamnose for RhaS, urea for UrcR, or alkylbenzoates for XylS, induces similar conformational changes that allow transcriptional activation of their target genes. Thus, the presence of these molecules constitutes the regulatory signals (13). The PerA-mediated expression of *bfpA* and *perA* in EPEC is negatively modulated by temperatures above or below 37°C, by the presence of ammonium, and by growth in rich medium (23, 35). Other AraC-like proteins involved in the regulation of virulence factors have also been shown to respond to environmental cues, such as temperature. However, no effector molecules controlling the activity of the members of this subfamily of AraC-like proteins have been identified. It remains to be determined whether proteins such as PerA also undergo conformational changes in response to

environmental or physicochemical signals that shift the protein from a constitutively active to inactive form.

## ACKNOWLEDGMENTS

We particularly thank A. Alagón, V. H. Bustamante, E. Calva, R. A. Edwards, G. Munson, N. Olivares, G. Pedraza, and Y. Rosenstein for advice and helpful discussions. We are also grateful to M. G. Sosa for constructing plasmid pMAL-T2, A. Vázquez for constructing the EPEC *perA*:Km strain, O. Rodríguez for providing HeLa cells for the adherence assays, J. A. Girón for the BfpA antibodies, R. P. Silver for the LexA-based system, V. H. Bustamante for the plasmid encoding the LexA-HNS fusion and pCAT + 27, E. Mata for animal care, and E. López-Bustos for oligonucleotide synthesis.

This research was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 33115-N) and the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN-217201) and by a Howard Hughes International Research Scholar Award to J.L.P. J.A.I. was supported by a Ph.D. Fellowship from CONACYT (no. 86036) and by the Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEPE), UNAM.

## REFERENCES

- Alagón, A. C., and T. P. Kling. 1980. Activation of polysaccharides with 2-aminothiolane and its use. *Biochemistry* 19:4341-4345.
- Bhende, P. M., and S. M. Egan. 1999. Amino acid-DNA contacts by RhaS: an AraC family transcription activator. *J. Bacteriol.* 181:5185-5192.
- Bleber, D., S. W. Ramer, C. Y. Wu, W. J. Murray, T. Tober, R. Fernandez, and G. K. Schoolnik. 1998. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 280:2114-2118.
- Bourgerie, S. J., C. M. Michan, M. S. Thomas, S. J. Busby, and E. L. Hyde. 1997. DNA binding and DNA bending by the MelR transcription activator protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 25:1685-1693.
- Bustamante, V. H., E. Calva, and J. L. Puente. 1998. Analysis of *actA*-acting elements required for *bfpA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180:3013-3016.
- Bustamante, V. H., F. J. Santana, E. Calva, and J. L. Puente. 2001. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Lex antagonizes HNS-dependent repression. *Mol. Microbiol.* 39:664-678.
- Dalnes, D. A., and R. P. Silver. 2000. Evidence for multimerization of Neu proteins involved in polymeric acid synthesis in *Escherichia coli* K1 using regulated LexA-based vectors. *J. Bacteriol.* 182:5267-5270.
- Dmitrova, M., G. Younes-Caust, P. Oertel-Buchheit, D. Porte, M. Schnorr, and M. Granger-Schnarr. 1998. A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Mol. Genet. Genet.* 257:205-212.
- Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Girón, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright, S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel, and J. B. Kaper. 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.
- Elliott, S. J., L. A. Wainwright, T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, Y. K. Deng, L. C. Lai, B. P. McNamara, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* 28:1-4.
- Frankel, G., A. D. Phillips, I. Rosenblum, G. Dowgan, J. B. Kaper, and S. Knutton. 1998. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol. Microbiol.* 30:911-921.
- Friedberg, D., T. Umanski, Y. Fang, and L. Rosenzweig. 1999. Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 34:941-952.
- Gállegos, M.-T., R. Schiefel, A. Balroch, K. Hofmann, and J. L. Ramos. 1997. AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:393-410.
- Gómez-Duarte, O. G., and J. B. Kaper. 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63:1767-1776.
- González-Pérez, M. M., J. L. Ramos, M.-T. Gállegos, and S. Márquez. 1999. Critical nucleotides in the upstream region of the XylS-dependent TOL meta-cleavage pathway operon promoter as deduced from analysis of mutants. *J. Biol. Chem.* 274:2286-2290.
- Griffith, K. L., and R. E. Wolf, Jr. 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.
- Hendrickson, W., and R. Schiefel. 1985. A dimer of AraC protein contacts three adjacent major groove regions of the *araI* DNA site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3129-3133.
- Hovey, A. K., and D. W. Frank. 1995. Analysis of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J. Bacteriol.* 177:4427-4436.
- Hulbert, R. R., and R. K. Taylor. 2002. Mechanism of ToxT-dependent transcriptional activation at the *Vibrio cholerae* *tcpA* promoter. *J. Bacteriol.* 184:5533-5544.
- LaRonde-LeBlanc, N., and C. Wolberger. 2000. Characterization of the oligomeric states of wild type and mutant AraC. *Biochemistry* 39:11593-11601.
- Lupas, A. 1996. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.* 21:375-382.
- Martin, R. G., and J. L. Rosner. 2001. The AraC transcriptional activators. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:132-137.
- Martínez-Laguna, Y., E. Calva, and J. L. Puente. 1999. Autoactivation and environmental regulation of *bfp7* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 33:153-166.
- Mellies, J. L., S. J. Elliott, V. Sperandio, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 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.
- Munson, G. P., L. G. Holcomb, and J. R. Scott. 2001. Novel group of virulence activators within the AraC family that are not restricted to upstream binding sites. *Infect. Immun.* 69:186-193.
- Munson, G. P., and J. R. Scott. 1999. Binding site recognition by Rna, a virulence regulator in the AraC family. *J. Bacteriol.* 181:2110-2117.
- Munson, G. P., and J. R. Scott. 2000. Rna, a virulence regulator within the AraC family, requires binding sites upstream and downstream of its own promoter to function as an activator. *Mol. Microbiol.* 36:1391-1402.
- Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142-201.
- Niland, P., R. Huhse, and B. Muller-Hill. 1996. How AraC interacts specifically with its target DNAs. *J. Mol. Biol.* 264:667-674.
- Okaka, L. N., J. A. Borreman, S. Shin, J. L. Mellies, L. E. Quinn, and J. B. Kaper. 2001. Comparative sequence analysis of the plasmid-encoded regulator of enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* 69:5553-5564.
- Ohshirovitch, I. N., and R. J. Kadner. 2002. DNA-binding activities of the HHC and HHD virulence regulatory proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 184:4148-4160.
- Ortiz, R., C. L. Samperi, J. L. Puente, and E. Calva. 1999. Negative and positive regulation of the non-omuregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Mol. Microbiol.* 32:243-252.
- Pena, C. A., C. Coker, J. D. Datta, and H. L. T. Mobley. 2001. Identification of the domains of UreR, an AraC-like transcriptional regulator of the urease gene cluster in *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol.* 183:4526-4535.
- Porter, M. E., and C. J. Dorman. 2002. In vivo DNA-binding and oligomerization properties of the *Shigella flexneri* AraC-like transcriptional regulator VhpA as identified by random and site-specific mutagenesis. *J. Bacteriol.* 184:531-539.
- Puente, J. L., D. Bleber, S. W. Ramer, W. Murray, and G. K. Schoolnik. 1996. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol. Microbiol.* 20:87-100.
- Rhee, S., R. G. Martin, J. L. Rosner, and D. R. Davies. 1998. A novel DNA-binding motif in MarA: the first structure for an AraC family transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1043-1048.
- Röder, K., and M. Schweizer. 2001. Running-buffer composition influences DNA-protein and protein-protein complexes detected by electrophoretic mobility-shift assay (EMSA). *Biotechnol. Appl. Biochem.* 33:209-214.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Santana, M. A., G. Pedraza-Alva, N. Olivares-Zavala, V. Madrid-Martín, V. Horejál, S. J. Burakoff, and Y. Rosenstein. 2000. CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NF- $\kappa$ B transcription factors in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 275:31460-31468.
- Savliola, B., R. Seabold, and R. F. Schiefel. 1998. Arm-domain interactions in AraC. *J. Mol. Biol.* 278:539-548.
- Shin, S., M. P. Castanle-Corset, J. W. Foster, J. A. Crawford, C. Brinkley, and J. B. Kaper. 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.
- Sohel, I., J. L. Puente, S. W. Ramer, D. Bleber, C.-Y. Wu, and G. K. Schoolnik. 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J. Bacteriol.* 178:2613-2628.
- Solomon, S. M., B. MacDougall-Shackleton, R. Schiefel, and C. Wolberger. 1997. Structural basis for ligand-regulated oligomerization of AraC. *Science* 276:421-425.

44. Sperandio, V., J. L. Mellies, W. Nguyen, S. Shin, and J. B. Kaper. 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.
45. Stone, K. D., H. Z. Zhang, L. K. Carlson, and M. S. Donnenberg. 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.
46. Tamai, E., T. A. Belyaeva, S. J. Busby, and T. Tsuchiya. 2000. Mutations that increase the activity of the promoter of the *Escherichia coli* melibiose operon improve the binding of MelR, a transcription activator triggered by melibiose. J. Biol. Chem. 275:17058-17063.
47. Thomas, V. J., and C. M. Collins. 1999. Identification of UreR binding sites in the *Enterobacteriaceae* plasmid-encoded and *Proteus mirabilis* urease gene operons. Mol. Microbiol. 31:1417-1428.
48. Tobe, T., T. Hayashi, C.-G. Han, G. K. Schoolnik, E. Ohtsubo, and C. Sasakawa. 1999. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. Infect. Immun. 67:5455-5462.
49. Tobe, T., G. K. Schoolnik, I. Sohel, V. H. Bustamante, and J. L. Puente. 1996. Cloning and characterization of *bfpTYW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 21:963-975.
50. Tobe, T., I. Tetsuno, E. Katayama, C. Y. Wu, G. K. Schoolnik, and C. Sasakawa. 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.
51. Tomoyasu, T., A. Mogk, H. Langer, P. Goloubinoff, and B. Bukau. 2001. Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. Mol. Microbiol. 40:397-413.
52. Ueguchi, C., C. Seto, T. Suzuki, and T. Mizuno. 1997. Clarification of the dimerization domain and its functional significance for the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. J. Mol. Biol. 276:145-151.
53. Valtanc, B. A., and B. B. Finlay. 2000. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:8799-8806.
54. Watfieu, P., and G. R. Cornella. 1994. Identification of DNA sequences recognized by VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia yop* regulon. J. Bacteriol. 176:3878-3884.
55. Yu, R. R., and V. J. DIRita. 2002. Regulation of gene expression in *Vibrio cholerae* by ToxT involves both antirepression and RNA polymerase stimulation. Mol. Microbiol. 43:119-134.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**ANEXOS**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**APENDICE II**