



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“Estudio del estado oligomérico del regulador LeuO de
Salmonella enterica serovar Typhi y su importancia en la
función reguladora”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

(MARIA DEL CARMEN GUADARRAMA ROMÁN)

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Edmundo Calva Mercado
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Lorenzo Segovia Forcella, Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. David Romero Camarena, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Ciudad de México. Junio, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente estudio se realizó bajo la asesoría del Dr. Edmundo Calva Mercado, en el Laboratorio No. 2 del Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México, en Cuernavaca, Morelos, México. El Laboratorio está bajo la responsabilidad del doctor Edmundo Calva Mercado.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Edmundo Calva Mercado

Dr. Lorenzo Segovia Forcella

Dr. David Romero Camarena

El jurado de Tesis estuvo integrado por:

Dr. Enrique Rudiño Piñero

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Dr. Dimitris Georgellis

Dra. Katy Juárez López

Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos

Durante la realización de este trabajo tuve un apoyo económico de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el numero de cuenta 184646. El Dr. Edmundo Calva tuvo apoyos económicos de CONACyT, México (no. 82383 y 179946). Además, recibí apoyo determinado para proyectos científicos asignado a el Dr. Ismael Hernández-Lucas, IHLDGAPA-UNAM.

Agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado, por la ayuda para asistir a los congresos:

I Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias. 22-25 de marzo de 2010. San Miguel Regla, Hidalgo, México.

The 2011 Madison molecular Genetics of Bacteria and Phages Meeting. 2-7 de agosto de 2011. University of Wisconsin Madison. USA.

112th General Meeting American Society for Microbiology, ASM. June 16-19 de junio de 2012. San Francisco California. USA.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE	2
LISTA DE FIGS.	5
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Generalidades de <i>Salmonella</i>	11
1.1.1 Epidemiología	11
1.1.2 Patogenia	12
1.2 Características de la Familia de Reguladores transcripcionales tipo LysR (LTTRs)	14
1.2.1 Organización de los dominios funcionales en los LTTR y su estructura tridimensional	15
1.2.2 Dominio de unión al ADN o DBD (DNA-Binding Domain)	16
1.2.3 Dominio Carboxilo: RD (Regulatory Domain) o EBD (Effector-Binding Domain)	16
1.2.4 Oligomerización	17
1.2.5 Modelo de regulación transcripcional de los LTTRs	21
1.3 LeuO es miembro de los LTTRs	24
1.3.1 LeuO es un regulador transcripcional global en <i>E. coli</i>	25
1.3.2 El regulador LeuO en otras Enterobacterias	26
1.3.3 Condiciones de expresión de LeuO	28
1.3.4 Función de LeuO <i>in vivo</i>	29

2. ANTECEDENTES	31
2.1 LeuO en <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi (<i>S. Typhi</i>)	31
2.2 El regulador LeuO es un antirrepresor	31
2.3. Oligomerización de los LTTRs y el extremo carboxilo	34
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVO GENERAL	35
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1 Cepas y condiciones de crecimiento	36
5.2 Transformación de las cepas bacterianas	36
5.3 Construcción de las mutantes puntuales	36
5.4 Construcción de las mutantes con remociones en el extremo carboxilo	37
5.5 Expresión y Purificación de LeuO y las mutantes por cromatografía de afinidad	38
5.6 Cromatografía de exclusión molecular o Filtración en Gel	39
5.7 Electroforesis de proteínas por SDS-PAGE	40
5.8 Geles de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE-NC)	40
5.9 Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA)	40
5.10 Inmunodetección (“western blot”)	41
5.11 Ensayo de la actividad específica CAT	42
5.12 Sistema de interacción proteína-proteína en bacterias basado en LexA	42
6. RESULTADOS	43
6.1 Análisis de la unión de LeuO al ADN (región reguladora de <i>ompS1</i>) purificada en condiciones nativas y desnaturalizantes	43

6.2 LeuO de <i>S. Typhi</i> forma tetrámeros en solución	44
6.3 Análisis de LeuO, purificada en condiciones nativas y desnaturalizantes por PAGE en condiciones nativas	46
6.4 El tetrámero de LeuO se une al ADN	47
6.5 Diferentes formas oligoméricas de LeuO en la preparación LeuO6x-His-DC	49
6.6 Residuos localizados en el DBD y LH de LeuO afectan la dimerización, mientras que residuos en el RD-I no intervienen en la formación de oligómeros	51
6.7 Las mutantes en el DBD, LH y RD-I (subdominio central) de LeuO, están afectadas en su función transcripcional	53
6.8 Las mutantes en el DBD, LH y RD-I (subdominio central) de LeuO no se unen al ADN	56
6.9 Las remociones en el extremo carboxilo de LeuO (subdominios RD-II y RD-I) afectan la dimerización	58
6.10 Las variantes con remociones en el C- terminal de LeuO, abarcando los subdominios RD-II y RD-I, están afectadas en su función transcripcional ...	59
6.11 Las variantes con remociones en el extremo carboxilo de LeuO no se unen al ADN	61
6.12 Las mutantes en los últimos cinco residuos de aminoácidos de LeuO dimerizan pero están afectadas diferencialmente en su función transcripcional	62
7. DISCUSIÓN	65
8. CONCLUSIONES	73
9. PERSPECTIVAS	74
10. BIBLIOGRAFÍA	75
11. ANEXO I Tablas	85
12. ANEXO II (Artículos publicados)	92

LISTA DE FIGS.

	Página
Fig. 1. Representación esquemática de los dominios característicos de los LTTRs	15
Fig. 2. Esquema de la estructura de los LTTRs	19
Fig. 3. Conformación del dímero y del tetrámero de los LTTRs	20
Fig. 4. Esquema del modelo de regulación clásico de los LTTRs	21
Fig. 5. Modelo de regulación de los LTTRs, “Step-binding model”	23
Fig. 6. Esquema de la localización de <i>leuO</i> en el cromosoma en <i>E. coli</i>	24
Fig. 7. Esquema de los genes regulados por LeuO en diferentes Enterobacterias ..	30
Fig. 8. Modelo del mecanismo regulación de LeuO como antirrepresor en el gen <i>ompSI</i> en <i>S. enterica</i> serovar Typhi	32
Fig. 9. Modelo de regulación de LeuO, “mecanismo de relevo de promotor”	33
Fig. 10. EMSA con LeuO-6xHis-DC y LeuO-6xHis-NC	44
Fig. 11. Cromatografía de exclusión molecular de LeuO	46
Fig. 12. El tetrámero de LeuO se une a ADN con mayor afinidad	48
Fig. 13. Diferentes formas oligoméricas de LeuO6xHis-DC, comparación con Ler	50
Fig. 14. Alineamiento múltiple de secuencias de LTTRs caracterizados y LeuO	52
Fig. 15. Análisis de dimerización y función transcripcional de LeuO Silvestre y las diferentes mutantes puntuales en el DBD y RD-I	55
Fig. 16. Unión al ADN de las mutantes L27A, L46A, S54A L60A T79A y P139A	57
Fig. 17. Las mutantes S54A y P139 no se unen al ADN	57
Fig. 18. Análisis de dimerización y de función reguladora de LeuO silvestre y las remociones en el extremo carboxilo	60
Fig. 19. Unión a DNA de las mutantes puntuales S54A y P139A	61
Fig. 20. Análisis de dimerización de las mutantes con sustituciones por alanina en cada uno de los últimos cinco residuos de LeuO (subdominio RD-I-terminal) 63	63
Fig. 21. Análisis de la función reguladora de las mutantes puntuales en cada uno de los últimos cinco residuos de LeuO (subdominio RD-I- terminal)	64
Fig. 22. Representación esquemática de la actividad transcripcional de LeuO silvestre y mutantes en el RD-I sobre <i>ompSI</i> (desrepresión) y <i>tpx</i> (represión)	72

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Valores de la Curva de calibración utilizados para CEM	45
Tabla 2. Cepas bacterianas utilizados en este estudio	85
Tabla 3. Plásmidos utilizados en este estudio	85
Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este estudio	88
Tabla 5. Antibióticos (dosis utilizadas)	91

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácido
ABS	Sitio de unión para activación (por sus siglas en inglés)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adesín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
DBD	Sitio de unión al ADN
DTT	ditiotreitól
°C	Grados centígrados
Ci	curíes
CN	Control negativo
cpm	cuentas por minuto
DC	Condiciones desnaturalizantes (por sus siglas en inglés)
D.O.	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilen-diaminotetra acético (por sus siglas en inglés)
EMSA	Ensayo de Movilidad Electroforética (por sus siglas en inglés)
F.T.	Fiebre Tifoidea
g	gramos
H-NS	Proteína asociada a estructura del nucleoide (por sus siglas en inglés)
IgA	Inmunoglobulina tipo A
IPTG	Isopropil-b-D-Thiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
KV	Kilovoltios
LH	Hélice enlazadora (por sus siglas en inglés)
LPS	Lipopolisacárido
LTTR	Reguladores transcripcionales tipo LysR (por sus siglas en inglés)
mA	Miliamperes

mg	Miligramos
mL	Mililitros
mut	mutante
mM	Milimolar
MN	Medio de cultivo nutritivo
M	Molar
NC	Condiciones nativas (por sus siglas en inglés)
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
ORF	Marco abierto de lectura (por sus siglas en inglés, open reading frame)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (por sus siglas en inglés)
pb	Pares de bases
PBS	Regulador salino de fosfatos (por sus siglas en inglés)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
pg	Picogramos
pH	potencial de hidrógeno (concentración de iones hidronio, $[H_3O]^+$)
PMA	Peso molecular aparente
RBS	Sitio de unión para reconocimiento (por sus siglas en inglés)
RD	Dominio de regulatorio (por sus siglas en inglés)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecil-sulfato de sodio (por sus siglas en inglés)
SPI	Isla de Patogenicidad de <i>Salmonella</i> (por sus siglas en inglés)
subsp	Subespecie
TTSS	Sistema de secreción tipo tres (por sus siglas en inglés)
μL	Microlitros
μM	Micromolar
Vi	Antígeno capsular Vi (Virulencia)
wHTH	Hélice-vuelta-Hélice alado (por sus siglas en inglés)
wt	silvestre (por sus siglas en inglés)

RESUMEN

LeuO es miembro de la familia de reguladores transcripcionales tipo LysR (LTTR), involucrado en la expresión de genes que participan en una gran variedad de procesos biológicos en *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi* y *Salmonella Typhimurium*. LeuO y otros LTTRs, tienen dominios funcionales: DBD (DNA-binding domain), de unión al ADN, localizado en el extremo amino, con un motivo hélice-vuelta hélice alado o winged Helix-turn-Helix (wHTH); una hélice larga o hélice enlazadora (LH, linker-helix), involucrada en la formación de dímeros; la LH conecta al DBD con el extremo carboxilo, denominado EBD (effector-binding domain) o RD (regulatory domain); dividido en subdominios RD-I y RD-II. Esta región, además de su función en la unión y respuesta al coinductor se ha involucrado en la formación de oligómeros. En este trabajo demostramos la formación de tetrámeros de LeuO en solución, este oligómero se une con mayor afinidad al ADN. Construimos una colección de mutantes puntuales en el DBD de LeuO, las cuales mostraron que esta región no solo está involucrada en la unión al ADN, también en la dimerización y en la función reguladora. Mutantes localizadas en RD-I, región central y C-terminal afectaron la regulación positiva, pero no la represión, ni su capacidad de dimerización. Las variantes de LeuO con remociones en C-terminal, abarcando los subdominios RD-II y RD-I fueron afectadas en la dimerización, la regulación transcripcional y la interacción con el ADN. Estos datos nos indican que además de la región C-terminal, el DBD de LeuO está involucrado en la dimerización y probablemente en la formación del tetrámero: por lo tanto, cada dominio actúa sinérgicamente para mantener la funcionalidad de LeuO de *S. Typhi*.

ABSTRACT

LeuO is a LysR-type transcriptional regulator (LTTR), which has been described as a global regulator in *Escherichia coli* and *Salmonella*, since it positively and negatively regulates the expression of genes involved in multiple biological processes. LeuO as other LTTR members, have well-defined functional domains: an N-terminal DNA-binding domain (DBD) with a winged helix-turn-helix (wHTH) motif; a long linker-helix (LH) involved in dimerization that connects the DBD with the C-terminal “effector-binding” domain (EBD) or “regulatory domain” (RD, subdomains RD-I and RD-II), which has been involved mainly in oligomerization. In this study we show that the oligomeric structure of LeuO is as a tetramer that binds with high affinity to DNA. A collection of single amino acid substitutions in the LeuO DBD domain indicates that it is involved in dimerization, in both positive and negative regulation and DNA-binding. Point mutations in the central and C-terminal regions of RD-I affected transcriptional activation, while they were not affected in transcriptional repression and dimerization. Deletions of the RD-II and RD-I C-terminal subdomains affected dimerization, binding to DNA and positive and negative regulation. Together, this data show that the C-terminal and DBD domains of LeuO are involved in dimerization and likely in tetramer formation, therefore each LeuO domain seems to act synergistically to maintain its regulatory functions in *S. Typhi*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de *Salmonella*

Salmonella, es un bacilo Gram-negativo móvil que pertenece a la familia Enterobacteraceae. El género *Salmonella*, consta de tres especies: *S. entérica*, *S. bongori* y *S. subterranea*; *S. enterica* se subdivide en 6 subespecies: I, *S. enterica* subsp. *enterica*; II, *S. enterica* subsp. *salamae*; IIIa, *S. enterica* subsp. *arizonae*; IIIb, *S. enterica* subsp. *diarizonae*; IV, *S. enterica* subsp. *houtenae*; VI, *S. enterica* subsp. *indica*. Las subespecies se divide en serotipos o serovares, clasificadas de acuerdo al esquema Kauffman-White, basado en los antígenos capsulares (Vi), flagelares (H) y al LPS (lipopolisacárido) (O). El nombre del serovar se escribe con la primer letra mayúscula, después de la subespecie, por ejemplo: *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), (Brenner *et al.*, 2000).

1.1.2 Epidemiología

Las bacterias del género *Salmonella* son patógenos capaces infectar humanos y otros vertebrados como aves y reptiles (Coburn *et al.*, 2007). Actualmente se reconocen para el género *Salmonella* 2463 serotipos, la mayoría de ellos (59%) pertenecen a *S. enterica* subsp. *enterica*, y aproximadamente el 99 % de las infecciones en humanos y otros animales son causadas por cepas pertenecientes a este serotipo (Popoff *et al.*, 1997).

En humanos la ingesta de varios serovares de *Salmonella* causa infecciones del intestino delgado y gastroenteritis, solo un pequeño número de serovares de *Salmonella* pueden causar una infección sistémica como la fiebre tifoidea (FT) cuyo agente causal es *Salmonella enterica* serovar Typhi (Mittrucker & Kaufmann, 2000). La fiebre tifoidea es una enfermedad de prevalencia mundial; se estima una tasa de 16 millones de casos por año, de los cuales aproximadamente 600,000 son fatales, en México se han reportado alrededor de 15 mil casos de FT al año (Pang *et al.*, 1998, Zaidi *et al.*, 2006). En los Estados Unidos y Europa la FT se presenta ocasionalmente y los brotes se controlan rápidamente, se presenta usualmente en personas que viajan a áreas endémicas. En

Latinoamérica, Asia y África, donde se localizan las zonas endémicas es donde la FT sigue siendo un problema de salud pública (Edelman & Levine, 1986, Coburn *et al.*, 2007).

La gastroenteritis en humanos es causada por varios serotipos no típicos, siendo *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), la aislada con mayor frecuencia (Raffatellu *et al.*, 2006) y son transmitidos por animales domésticos a humanos lo cual representa un serio problema de la industria alimentaria (Mastroeni, 2002). La Salmonelosis es un problema de salud pública mundial, se puede presentar una infección intestinal aguda en personas de todas las edades y puede llegar a ser invasiva, causando bacteremia y meningitis en lactantes, ancianos y pacientes inmunosuprimidos (Goldberg & Rubin, 1988, Zaidi *et al.*, 2006). En los Estados Unidos de América y el Reino Unido, al año ocurren más de 1.4 millones y 73 mil infecciones por *Salmonella* no-Typhi, respectivamente, además se estima que este patógeno es responsable de aproximadamente 30% de las muertes relacionadas a infecciones transmitidas por alimentos (Zaidi *et al.*, 2006)

1.1.3 Patogenia

El período de incubación de *Salmonella* en una gastroenteritis es de 12 a 72 horas, la infección se restringe al intestino y la mucosa intestinal y se prolonga por aproximadamente 10 días, tiempo en el cual la infección es contenida por el sistema inmune. En la FT el período de incubación es más largo, de 5 a 9 días, puede provocar síntomas como fiebre, que se prolonga hasta por 3 semanas, dolor de cabeza, esplenomegalia entre otros (Raffatellu *et al.*, 2008). La infección por *Salmonella* es difícil de controlar debido a la capacidad de la bacteria a resistir a el estrés ambiental, su amplia distribución, la resistencia a antibióticos y su plasticidad genética (Chen *et al.*, 2013)

La infección ocurre a través de la vía oral, por la ingesta de agua o alimentos contaminados. Después de la ingestión, una proporción de las bacterias resisten el pH ácido del estómago y a varios de los mecanismos de resistencia en el lumen intestinal, como las sales biliares, la lisozima, las defensinas, e IgA neutralizantes (Calva *et al.*, 1988, Coburn *et al.*, 2007). Una proporción de las bacterias que resistieron el pH bajo del estómago; colonizan el intestino delgado, donde se adhiere a las células epiteliales mediante varias

fimbrias (Cotter & DiRita, 2000). En el epitelio intestinal, dichas bacterias invaden valiéndose de la activación de genes de virulencia codificados en la isla de patogenicidad de *Salmonella*-1 (SPI-1). Después de que *Salmonella* penetra el epitelio intestinal, esta se dirige a las placas de Peyer, los cuales son órganos linfoides secundarios localizados en la mucosa intestinal. Una vez que *Salmonella* atraviesa el epitelio, se encuentra con los macrófagos residentes en la lámina propia, donde induce su internalización por fagocitosis. Subsecuentemente, *Salmonella* activa mecanismos de virulencia para evadir las funciones antimicrobianas del macrófago, lo que le permite sobrevivir y replicarse en el ambiente intracelular. (Mastroeni, 2002). La sobrevivencia de *Salmonella* dentro del macrófago involucra la activación del sistema de dos componentes PhoP/PhoQ y otros factores de virulencia codificados en la isla de patogenicidad de *Salmonella*-2 (SPI-2). PhoQ es una proteína de membrana que actúa como sensor de señales ambientales y es capaz de autofosforilarse; a su vez transfiere el fosfato a PhoP, el regulador transcripcional. Las salmonelas que sobreviven en el macrófago son transportadas desde los ganglios mesentéricos al torrente sanguíneo, causando una septicemia e invadiendo órganos como hígado y bazo (Mastroeni, 2002).

Para los patógenos tan recurrentes como *Salmonella* la regulación de la expresión genética le permite contender con diferentes condiciones; tanto en vida libre como en el hospedero. Por esta razón, la función de los reguladores transcripcionales involucrados en este proceso son de gran importancia y su estudio es necesario para el entendimiento de los mecanismos de sobrevivencia de *Salmonella* en condiciones de estrés (Lahiri *et al.*, 2009). Por lo tanto el estudio de *Salmonella*, desde la biología molecular y la epidemiología han sido importantes para el entendimiento de la relación entre el hospedero y la bacteria (Calva *et al.*, 1988).

Así mismo, el conocimiento de los mecanismos de acción de los reguladores transcripcionales globales ha sido fundamental para el estudio de la virulencia, el progreso de la enfermedad, el crecimiento y metabolismo de las bacterias, así como los mecanismos de resistencia a antibióticos, los cuales son cada vez más recurrentes (Maddocks & Oyston, 2008).

1.2 Características de la Familia de Reguladores transcripcionales tipo LysR (LTTRs)

Los reguladores transcripcionales tipo LysR (LTTRs, por sus siglas en inglés), son un grupo de proteínas que se encuentran distribuidas ampliamente en procariontes, pero también se han identificado algunos reguladores en arqueas y en cloroplastos de algas (Perez-Rueda & Collado-Vides, 2001, Stec *et al.*, 2006, Sun & Klein, 2004, Maddocks & Oyston, 2008). Los LTTRs forman la familia de reguladores transcripcionales con el mayor número de miembros, actualmente se reconocen más de 85,000 miembros potenciales en la Pfam data base (PF00126 HTH_1, LysR_substrate) (Punta *et al.*, 2012). Este número, así como la variedad y distribución de los LTTRs se refleja en su asociación con la expresión de un gran número de genes y regulones, los cuales están involucrados en procesos como la biosíntesis de aminoácidos, catabolismo de compuestos aromáticos, resistencia a antibióticos, respuesta a estrés oxidativo, fijación de nitrógeno, “quorum-sensing” y virulencia, división celular, movilidad, producción de toxinas, adherencia y secreción (Schell, 1993, Tropel & van der Meer, 2004, Pareja *et al.*, 2006, Maddocks & Oyston, 2008)

Los miembros de la familia codifican para proteínas cuyo tamaño oscila entre 215 a 354 residuos de aminoácidos (Perez-Rueda & Collado-Vides, 2000). Responden a una gran variedad de co-inductores (compuestos aromáticos, alifáticos, iones, derivados de aminoácidos) para activar la transcripción de genes o regulones. Sin embargo, independientemente de la presencia del co-inductor, tienen la capacidad de unirse a sus genes blancos en secuencias de ADN que tienen posiciones y motivos estructurales similares. En un principio se describieron como activadores de un promotor divergente muy cercano, ya que cuando existe la sobre posición de promotores, la transcripción es bidireccional y simultánea (Schell, 1993). Sin embargo, actualmente se reconocen como reguladores transcripcionales globales, con actividad dual, capaces de activar o reprimir la transcripción de un gen u operón divergente y en otros casos los genes blanco están localizados en otro sitio distante en el cromosoma (Perez-Rueda & Collado-Vides, 2000, Maddocks & Oyston, 2008).

1.2.1 Organización de los dominios funcionales en los LTTRs y su estructura tridimensional

Los LTTRs tienen una organización de dominios funcionales muy conservada, los cuales fueron determinados en un principio, por alineamientos de secuencias y mutagénesis de algunos reguladores de la familia; esto también permitió localizar residuos que al ser sustituidos alteraban su función (Schell, 1993). Posteriormente, se obtuvo la estructura parcial de algunos LTTRs, como CysB, OxyR, DntR, y CatM, ya que el dominio de unión a ADN o DBD (DNA-binding domain) no se pudo resolver (Verschueren *et al.*, 1999, Choi *et al.*, 2001, Smirnova *et al.*, 2004, Ezezika *et al.*, 2007, Ezezika *et al.*, 2006, Craven *et al.*, 2009, Clark *et al.*, 2004). Sin embargo, en trabajos posteriores se resolvió la estructura de seis proteínas completas: CbnR, CrgA, ArgP, TsaR, BenM y AphB (Muraoka *et al.*, 2003, Sainsbury *et al.*, 2009, Zhou *et al.*, 2010, Monferrer *et al.*, 2010, Taylor *et al.*, 2012, Ruangprasert *et al.*, 2010), con lo cual se pudo definir de manera más detallada la organización de los dominios funcionales de estos reguladores (Fig. 1).

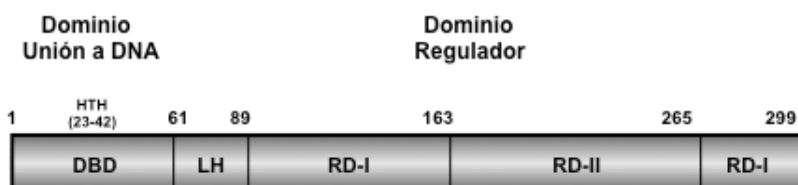


Fig. 1. Representación esquemática de los dominios característicos de los LTTRs. DBD (“DNA binding domain” o Dominio de unión a ADN), residuos 1-60; LH (“Linker Helix” o hélice enlazadora), residuos 61-89; RD (“Regulatory domain” o Dominio Regulador), RD-I (central, residuos 90-163), RD-II (residuos 164-265), RD-I (terminal, residuos 266-299) (Schell, 1993, Sainsbury *et al.*, 2009).

1.2.2 Dominio de unión al ADN o DBD (DNA-Binding Domain)

Este dominio comprende alrededor de 60 residuos del extremo amino, en esta región es donde existe la mayor identidad de secuencia de aminoácidos entre los LTTRs (40%), (Schell, 1993). En la zona central, del residuo 23 al 42, se encuentra el motivo de unión al ADN, wHTH o Hélice-vuelta-Hélice alado (Muraoka *et al.*, 2003, Maddocks & Oyston, 2008). Sin embargo, aproximadamente 15 residuos a ambos lados del motivo wHTH, se ha descrito que están involucrados en la unión específica del regulador al promotor blanco (Schell, 1993).

A partir de los residuos 61 al 90, se localiza una hélice larga, LH (“Linker Helix o hélice enlazadora), la cual se ha involucrado en la formación de dímeros; ésta hélice conecta el DBD con el dominio carboxilo (Fig. 1)(Muraoka *et al.*, 2003, Sainsbury *et al.*, 2009).

1.2.3 Dominio Carboxilo: RD (Regulatory Domain) o EBD (Effector-Binding Domain)

El dominio RD se compone de la mayor parte de la proteína, del residuo 90 en adelante; a lo largo de este dominio se han localizado residuos principalmente involucrados en el reconocimiento o unión así como la respuesta al co-inductor (Schell, 1993, Muraoka *et al.*, 2003, Sainsbury *et al.*, 2009, Zhou *et al.*, 2010). Entre los LTTRs, el dominio carboxilo muestra menos identidad y solamente algunas zonas, como la que comprende de los residuos 236 al 246, muestran cierta conservación (Schell, 1993). En algunos LTTRs, mutantes en la región antes mencionada mostraron alteraciones en la respuesta al co-inductor y algunas además afectaban la unión al ADN, sin embargo no fueron transdominantes, por lo cual se ha especulado que esta región podría estar involucrada en la oligomerización (Maxon *et al.*, 1990, Schell *et al.*, 1990, Bartowsky & Normark, 1991, Schell, 1993).

El dominio RD se divide en dos subdominios, RD-I y RD-II (Fig. 1), los cuales se conectan por dos regiones “cross-over”, alrededor del residuo 160-170 y la otra de 260-272; estas regiones al parecer le dan flexibilidad a la proteína, lo que podría permitir cierta movilidad a los subdominios. La conformación de este dominio permite que se forme una

tipo de bisagra o hendidura, donde se cree que se puede acomodar el co-inductor (Fig. 2) (Muraoka *et al.*, 2003, Stec *et al.*, 2006, Maddocks & Oyston, 2008). Debido a la conformación tridimensional que adquiere el monómero, el subdominio RD-I se compone de dos regiones separadas en la cadena polipeptídica, el subdominio RD-I central y subdominio RD-I terminal, el subdominio RD-II se localiza en medio de los dos subdominios RD-I (Fig. 2) (Muraoka *et al.*, 2003, Sainsbury *et al.*, 2009).

1.2.4 Oligomerización

Algunos de los LTTRs estudiados como NahR, CysB, CbnR, DntR, ArgP, TsaR y AphB forman tetrámeros, que corresponde a la forma oligomérica funcional (Schell *et al.*, 1990, Hryniewicz & Kredich, 1994, Muraoka *et al.*, 2003, Smirnova *et al.*, 2004, Monferrer *et al.*, 2010, Zhou *et al.*, 2010, Taylor *et al.*, 2012). A la fecha solo se ha determinado la estructura de seis proteínas completas, CbnR, CrgA, ArgP, TsaR, BenM y AphB, las cuales, a excepción de CrgA y BenM, forman tetrámeros (Muraoka *et al.*, 2003, Sainsbury *et al.*, 2009, Zhou *et al.*, 2010, Monferrer *et al.*, 2010, Taylor *et al.*, 2012, Ruangprasert *et al.*, 2010). Es importante destacar, que este número es muy bajo si se compara con el gran número de miembros de la familia, esto en parte se debe a que al ser sobre expresados, presentan insolubilidad; principalmente cuando se trata de la proteínas completas, lo que los ha hecho muy difícil de purificar (Ezezika *et al.*, 2007).

Otros LTTRs, como MetR, CatR, IlvY, NodD3, Nac, e IciA, forman dímeros en solución y al parecer ésta es su forma activa (Maxon *et al.*, 1990, Parsek *et al.*, 1992, Fisher & Long, 1993, Bender, 1991, Muse & Bender, 1999, Thony *et al.*, 1991). Además, para otros LTTRs se ha descrito una tercera clase de formación de oligómeros, como CrgA, el cual forma octámeros, mientras que HsdR forma octámeros o hexámeros (Sainsbury *et al.*, 2009, Ruangprasert *et al.*, 2010, Gong *et al.*, 2012).

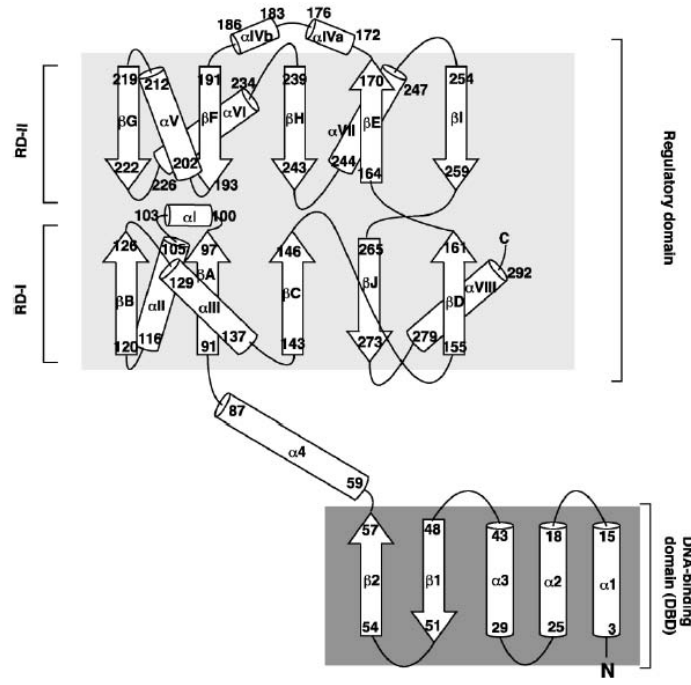
Se ha descrito que el tetrámero tiene una forma helicoidal, el cual se divide en dos partes: la primera parte está constituida por el cuerpo principal (con forma de diamante), lo conforman los cuatro RDs y las dos uniones tipo coiled-coil (dos LH), mientras que la segunda parte lo conforman los cuatro DBDs, los cuales se localizan en la base del cuerpo principal del tetrámero.

Se considera que el tetrámero se forma vía la interacción de un “dímero de dímeros”; la dimerización ocurre a través de la LH de cada subunidad con interacción tipo coiled-coil, en forma anti paralela (Fig. 3) (Muraoka *et al.*, 2003).

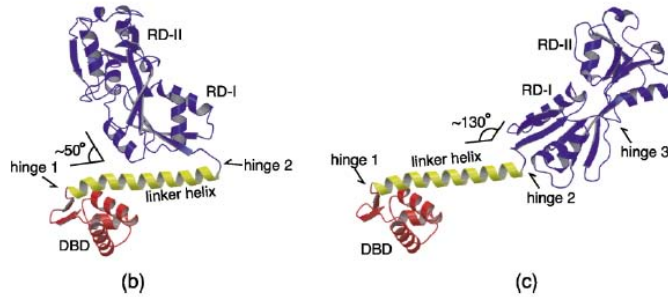
Cada dímero se forma con dos subunidades que adoptan dos conformaciones diferentes: un monómero adopta una forma compacta (A y P) y el otro una forma extendida (B y Q), que se ensamblan de manera alternativa para formar el dímero AB y PQ (Fig. 3). No obstante, la estructura es casi la misma, existen diferencias en la disposición de los dominios RDs en la subunidad compacta o extendida, la diferencia se origina por cambios conformacionales en la bisagra 2 (Fig. 3). Estas dos conformaciones se describieron primero para CbnR y fueron confirmadas posteriormente para otros LTTRs, excepto para CrgA, donde solo se observó la conformación parecida a la forma compacta, que conlleva a la formación de octámeros con una estructura “ring-like” (Muraoka *et al.*, 2003, Sainsbury *et al.*, 2009, Zhou *et al.*, 2010). Actualmente se desconoce como es qué estas subunidades similares adoptan conformaciones diferentes en el tetrámero (Muraoka *et al.*, 2003).

En cada subunidad hay tres regiones tipo bisagras: hinge 1, localizada en el DBD; hinge 2, que une la LH y el dominio RD; hinge 3, que está compuesta por las dos regiones “crossover” que se forman entre RD-I y RD-II, esta última parece cambiar su conformación dependiendo de señales en el ambiente posiblemente una vez que se une el co-inductor (Muraoka *et al.*, 2003, Momany & Neidle, 2012).

Para la formación del tetrámero intervienen interacciones entre los RD de cada subunidad; donde la subunidad A del dímero AB interacciona con el RD de las ambas subunidades del dímero PQ; mientras que la subunidad B solo interacciona con la subunidad P (Fig. 3) (Muraoka *et al.*, 2003).



(a)



(b)

(c)

Fig. 2. Esquema de la estructura de los LTTRs. Modelo de la estructura de CbnR; (a) Representación de α -hélices (cilindros) y cadenas β (flechas), muestra la conformación del DBD en el extremo amino; la hélice enlazadora o linker hélice ($\alpha 4$); conformación de Dominio Regulador, RD-I y RD-II, en el extremo carboxilo. Estructura de la subunidad, forma compacta (b) y forma extendida (c); muestra la localización de los DBDs, LHs y RDs así como las regiones de bisagra: hinge 1, hinge 2 y hinge 3 en cada forma; también se muestra la diferencia en los ángulos de inclinación del RD con respecto a la LH en la forma compacta y extendida (Muraoka *et al.*, 2003).

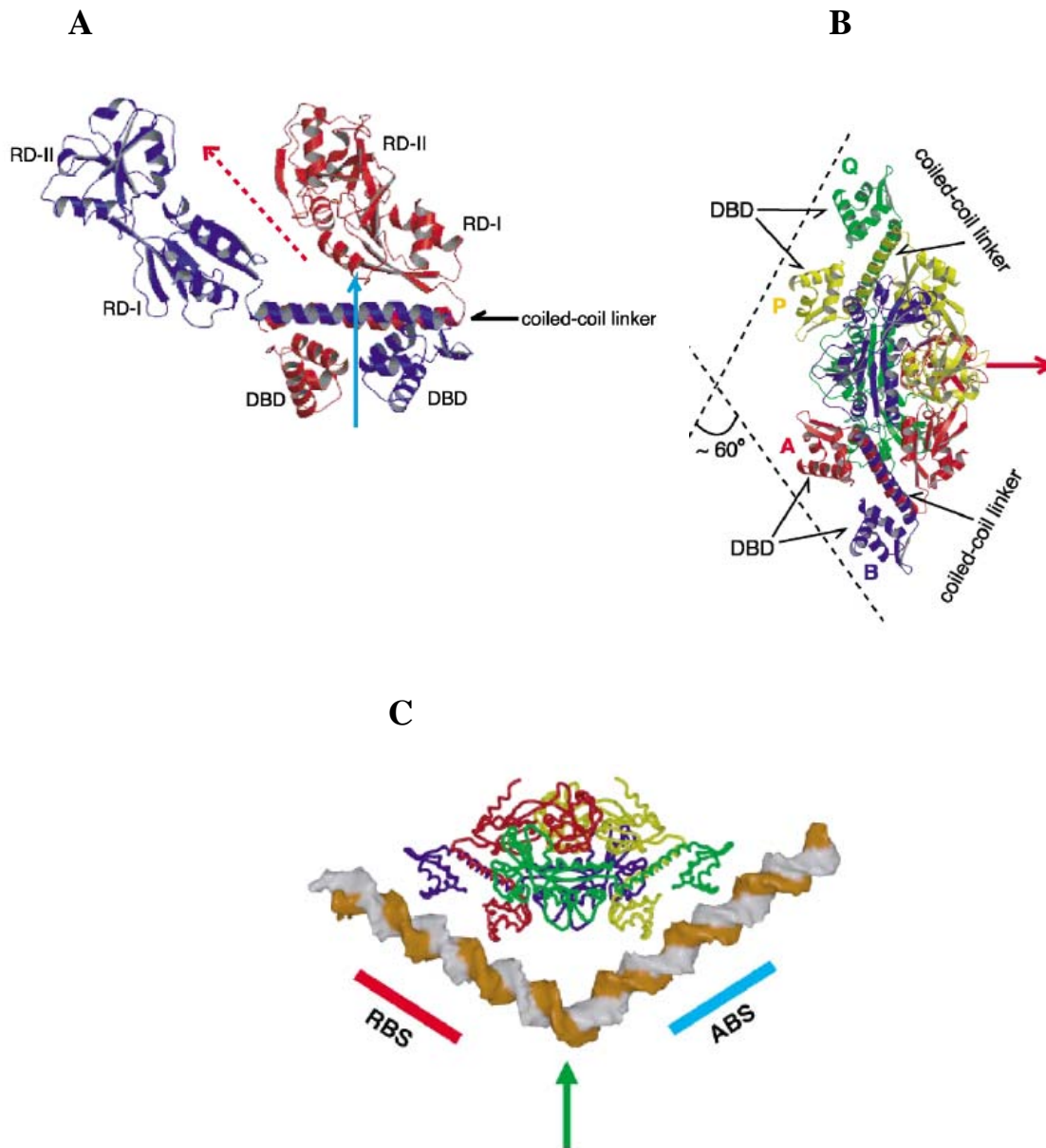


Fig. 3. Conformación del dímero y del tetrámero de los LTRs. Modelo basado en CbnR; A) Representación de la formación del dímero mediante la interacción tipo coiled-coil de las dos LH de cada monómero, forma compacta y forma extendida. B) Formación del tetrámero mediante la interacción de dos dímeros, a través de interacciones entre las diferentes regiones de los RDs de cada monómero. C) Modelo de interacción del ADN con el tetrámero, con forma helicoidal, y el acomodo de los cuatro DBDs, causando un doblez en una región central, entre el sitio de unión para reconocimiento (RBS) y el sitio de unión para activación (ABS) (Muraoka *et al.*, 2003).

1.2.5 Modelo de regulación transcripcional de los LTTRs

En el modelo clásico de regulación, los LTTRs activan la transcripción de un gen u operón divergente a su propio promotor, en algunos casos existe la sobre posición de promotores, por lo que son represores de su propia transcripción (Schell, 1993). OxyR no responde a un co-inductor clásico, pero responde al H_2O_2 y se activa a través de la formación de un puente di-sulfuro transitorio, esto provoca cambios en su conformación y afinidad por al ADN (Fig. 4). Se ha observado que en su estado reducido se encuentra como dímero y en su forma oxidada forma tetrámero (Kullik *et al.*, 1995a, Kullik *et al.*, 1995b). OxyR oxidado también influye en la interacción cooperativa de la ARN polimerasa en el promotor para iniciar la transcripción (Zaim & Kierzek, 2003).

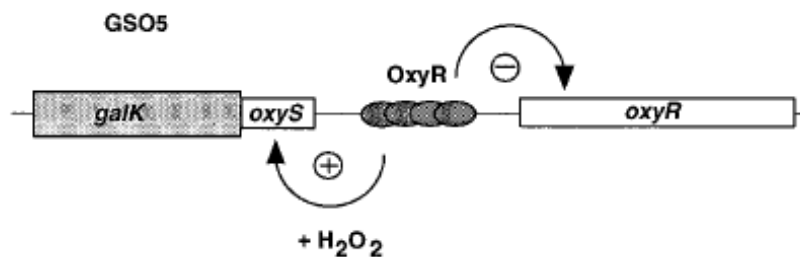


Fig. 4. Esquema del modelo de regulación clásico de los LTTRs. Modelo de regulación de OxyR; el regulador OxyR se disocia de su promotor (auto-regulación negativa -), en su estado reducido, y en presencia de H_2O_2 es oxidado y puede unirse al sitio de activación para activar la transcripción + de su gen divergente *oxyS* (Kullik *et al.*, 1995a, Kullik *et al.*, 1995b).

Actualmente se conocen más detalles del mecanismo de regulación para los LTTRs que forman tetrámeros, en gran parte por los trabajos de estructura. Se ha descrito que los cuatro DBDs presentes en el tetrámero interaccionan con una secuencia de ADN de aproximadamente 50-60 pb. Generalmente contiene dos sitios: RBS (sitio de unión de reconocimiento), el cual presenta el motivo T-N₁₁-A (LTTR-box) y es el primer sitio de unión y el ABS (sitio de unión de activación), el cual está próximo o algunas veces se sobrepone con la región -35 del inicio de la transcripción del gen blanco. Se ha propuesto que primero se une un dímero al RBS y esto ayuda para la unión de un segundo dímero al

ABS, promoviéndose la formación de un tetrámero inestable. La unión del inductor cambia la afinidad por los sitios, la forma sin co-inductor se une al sitio RBS, mientras que el sitio ABS solo es ocupado una vez que el co-inductor se ha unido (Tropel & van der Meer, 2004). Se ha sugerido que la unión del co-inductor provoca cambios conformacionales en los RDs (Tyrrell *et al.*, 1997) y es probable que estos cambios se propaguen a otras partes de la molécula dando como resultado cambios conformacionales en todo el tetrámero (Muraoka *et al.*, 2003). Estos cambios podrían propagarse a los DBDs, lo cual podría ayudar a estabilizar al tetrámero y así liberar el sitio donde se une la ARN polimerasa y permitir la transcripción. (Maddocks & Oyston, 2008).

Al parecer la forma helicoidal del tetrámero de varios LTTRs les permite cubrir y doblar una región grande en el ADN (Hryniewicz & Kredich, 1994). Esta característica común entre los LTTRs parece coincidir con la forma en “V” que adoptan los DBDs y se adapta perfectamente con la distancia y configuración de los dos sitios de unión, lo que ayuda a crear modelos de unión al ADN (Muraoka *et al.*, 2003, Maddocks & Oyston, 2008).

Existen ejemplos de LTTRs, que forman dímeros en los cristales (DntR) o en solución (ArgP), sin embargo el tetrámero es la forma activa para estos reguladores y se ha propuesto que se requiere la interacción con el ADN para la formación del tetrámero. Se ha propuesto un modelo de regulación por etapas “step-binding model”, donde el dímero I se une al sitio RBS de mayor afinidad, lo cual ayuda al dímero II a unirse al sitio ABS. En esta asociación débil del dímero de dímeros, algunos sitios de unión del ARN polimerasa pueden estar cubiertos por el dímero II, lo que impide la transcripción. Una vez que se une el co-inductor suceden cambios conformacionales en los RDs y DBDs, lo que ayuda también a estabilizar al tetrámero y a liberar los sitios donde se une la ARN polimerasa y formar el complejo ternario (Fig. 5) (Zhou *et al.*, 2010). En ambos casos, ya sea los que forman tetrámeros o dímero en solución; la llamada estructura de “dímero de dímeros” parece ser importante, para la interacción correcta de los DBDs con el ADN (Maddocks & Oyston, 2008).

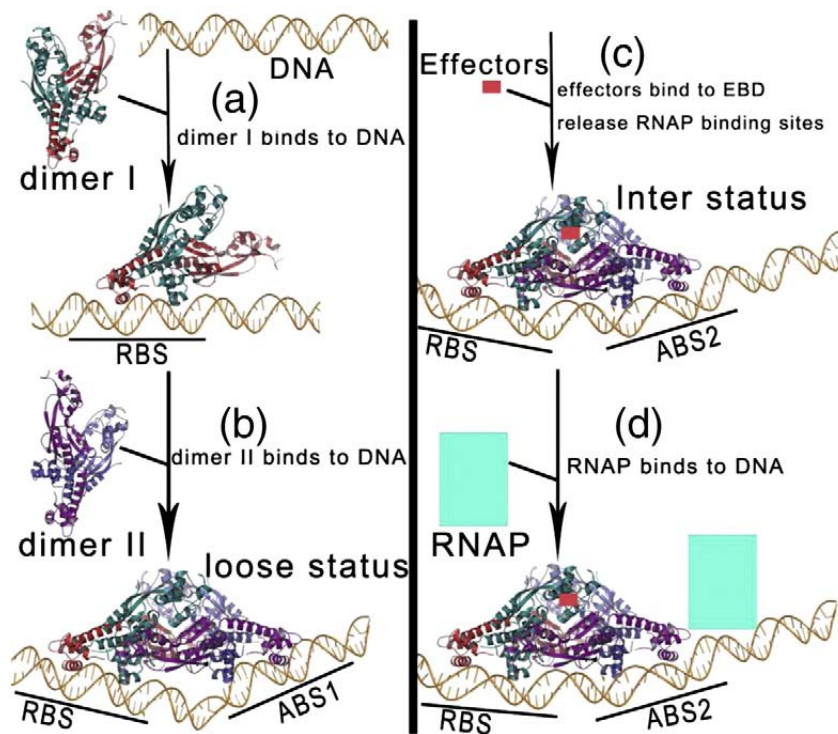


Fig. 5. Modelo de regulación de los LTRs, “Step-binding model”. Modelo de regulación de ArgP: **(a)**, Primero se une un dímero (dímero I) con una gran afinidad al ADN en sitio RBS libre. **(b)**, Un segundo dímero se une al sitio ABS por medio de la interacción con los RDs del dímero I (loose status). **(c)**, unión del co-inductor lo que provoca cambios conformacionales en el “dímero de dímeros”, lo cual podría estabilizar a el “dímero de dímeros” formando un tetrámero más estable, lo que conduce a que se libere el sitio de unión de la ARN polimerasa **(d)**, unión de la ARN polimerasa, con ayuda del tetrámero formado, y así puede iniciar la transcripción (Zhou *et al.*, 2010).

Los estudios de mutagénesis y de estructuras cristalográficas han proporcionado datos importantes acerca de la relación entre la estructura y la función de los LTRs. Sin embargo, no es claro por qué algunos funcionan como dímeros y pueden prescindir del extremo carboxilo y otros funcionan como tetrámeros y su dominio carboxilo se requiere para oligomerizar y funcionar adecuadamente (Momany & Neidle, 2012).

1.3 LeuO es miembro de los LTTRs

LeuO es reconocido como miembro de la familia de reguladores transcripcionales tipo LysR (LTTRs) (Henikoff *et al.*, 1988). El gen *leuO* se localiza entre los operones *ilvIH* (biosíntesis de isoleucina y valina) y *leuABCD* (biosíntesis de leucina) (Fig. 6), debido a esto en un principio se propuso a LeuO como un regulador del operón *leuABCD*: sin embargo, una cepa de *E. coli* mutante en *leuO* ($\Delta leuO$) no es auxótrofa para leucina (Ueguchi *et al.*, 1998).

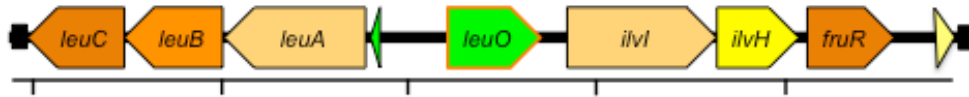


Fig. 6. Esquema de la localización de *leuO* en el cromosoma en *E. coli*. El gen *leuO* que codifica para el regulador LeuO se encuentra localizado entre los operones *leuABC* e *ilvIH*.

1.3.1 LeuO es un regulador transcripcional de global en *E. coli*

En *E. coli* se determinó que LeuO regula la expresión de genes involucrados en diferentes procesos celulares. Se describió que LeuO regula negativamente la transcripción del gen *cadC*, esto en una cepa mutante en el regulador H-NS, donde se liberaba la expresión de *leuO* (Shi & Bennett, 1995). CadC es el regulador positivo del operón *cadAB*, involucrado en la respuesta de la bacteria a cambios de pH (Soksawatmaekhin *et al.*, 2004). También, se encontró como represor de la expresión del ARN regulador DsrA, el cual se requiere para incrementar la traducción de *rpoS*. (Klauck *et al.*, 1997). H-NS, es una proteína forma dímeros que al unirse se al ADN forman oligómeros más grandes y pueden extenderse y de está manera reprimir la expresión de muchos genes, aparentemente no relacionados, reconociendo estructuras, como la curvatura del ADN (Durrenberger *et al.*, 1991, Yamada *et al.*, 1991, Tanaka *et al.*, 1991, Sonnenfield *et al.*, 2001).

LeuO también puede actuar como un regulador positivo, libera la expresión del operón *bgl*; el cual está involucrado en la utilización de β -glucósidos, tales como salicina y arbutina (Bertin *et al.*, 1990). La expresión del operón *bgl* es reprimida por el regulador H-NS (Ueguchi *et al.*, 1998).

En algunas cepas de *E. coli* patógenas de aves, LeuO regula positivamente al operón *yjjQ-bglJ*; a su vez estos genes están reprimidos por H-NS (Lawrenz & Miller, 2007, Stratmann *et al.*, 2008). Además, LeuO en *Escherichia coli* regula la expresión de genes involucrados en la sensibilidad al compuesto sulfametaxona, mientras que el incremento en su propia expresión se da durante la transición a fase estacionaria y aún después de una semana de crecimiento en cultivo, al mismo tiempo que la concentración de H-NS se reduce. En algunos estudios, se ha encontrado que LeuO regula la expresión de genes involucrados en la respuesta a estrés, como una chaperona criptica/fimbria tipo “usher”, ya que mutantes en *leuO*, y en algunos genes que codifican para proteínas de fimbrias, presentaron deficiencias o alteraciones en la formación de biopelículas (Shimada *et al.*, 2009, Shimada *et al.*, 2011).

1.3.2 El regulador LeuO en otras Enterobacterias

Además, de los estudios realizados en *E. coli*, en otras enterobacterias se han descrito varios genes regulados positivamente por LeuO, que a su vez están reprimidos por H-NS como *rovA* de *Yersinia enterocolitica* (Lawrenz & Miller, 2007). *RovA*, el regulador de la expresión del gen *inv*, que codifica para una adhesina, y es el factor principal de la colonización (Revell & Miller, 2000).

Recientemente en *S. Typhimurium*, se reportó que LeuO incrementa la expresión de *sdiA*, a niveles bajos (Turnbull *et al.*, 2012). Se ha propuesto que *SdiA* responde a señales producidas por otros organismos (Michael *et al.*, 2001, Smith & Ahmer, 2003); y recientemente, estudios demostraron que *SdiA* se puede activar en el intestino de tortugas y ratones y responde a AHLs (N-acyl homoserine lactones), una señal de “quorum-sensing” producida por otras bacterias (Ahmer *et al.*, 2007, Gorshkov *et al.*, 2010, Mei *et al.*, 2010, Weeks *et al.*, 2010).

En *S. Typhimurium*, usando ChIP-chip, se reportaron otros genes regulados por LeuO, incluyendo genes de las islas de patogenicidad SPI-1 y SPI-2. También se encontró que LeuO puede unirse y regular diferencialmente la expresión de genes, dependiendo de su concentración en la célula. Se encontró la probable unión de LeuO a sitios intragénicos, y la sobre posición con sitios de unión de la ARN polimerasa y de H-NS, lo cual refuerza la idea de que LeuO actúa como antagonista global de este regulador (Dillon *et al.*, 2012, Hernandez-Lucas & Calva, 2012).

Además, recientemente se demostró en *Vibrio vulnificus* que LeuO reprime a *vvpS*, VvpS es una exoproteasa cuya expresión se activa durante la fase estacionaria de crecimiento por los reguladores SmcR, un regulador maestro de quórum-sensing y por CRP. SmcR y CRP compiten por los sitios de unión con LeuO, siendo este un ejemplo donde LeuO parece ser un antagonista de dos activadores impidiendo la expresión de genes que no se requieren en la fase de crecimiento exponencial pero sí en fase estacionaria (Kim *et al.*, 2015)

En *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) se encontró que al sobre expresar LeuO, éste inducía la expresión de los genes quiescentes *ompS2* y *ompS1*, que codifican para las porinas OmpS2 y OmpS1, respectivamente (Fernandez-Mora *et al.*, 2004, De la Cruz *et al.*, 2007). También se ha descrito que la concentración de LeuO afecta diferencialmente la expresión de estas dos porinas; a bajas concentraciones se expresa OmpS2 mientras que en altas concentraciones se expresa OmpS1 y se reprime la expresión de OmpS2 (De la Cruz *et al.*, 2007).

Posteriormente, en la cepa silvestre IMSS1 de *S. Typhi*, mediante un estudio de proteómica, se encontraron más genes regulados por LeuO. En donde LeuO induce la expresión de AssT y del ORF STY3070, además de las reportadas anteriormente, OmpS2 y OmpS1, además se encontró que reduce la expresión OmpX, Tpx y el ORF STY1978 (Hernandez-Lucas *et al.*, 2008). Los genes regulados por LeuO en *S. Typhi*, están involucrados en varias funciones celulares: Primero, la porina quiescente OmpS1 se ha relacionado con la movilidad tipo “swarming”, la formación de biopelículas y la virulencia (Toguchi *et al.*, 2000, Mireles *et al.*, 2001, Rodriguez-Morales *et al.*, 2006).

Además, las porinas OmpS1 y OmpS2 se han relacionado con la respuesta inmune inducida por *Salmonella* en humanos, lo cual es importante para completar la respuesta inmune activada por las porinas OmpC y OmpF, las cuales son proteínas muy abundantes de la membrana externa. Estos últimos hallazgos han sido utilizados en estudios donde se evalúan las porinas como inmunógenos y se propone la utilización de estas moléculas como componentes importantes de vacunas contra la fiebre tifoidea (Secundino *et al.*, 2006, Moreno-Eutimio *et al.*, 2013).

AssT es una enzima arilsulfato sulfotransferasa involucrada en la detoxificación, transformando compuestos fenólicos tóxicos en compuestos no tóxicos (Kang *et al.*, 2001). El operón *assT-dsbL-dsbI* también es regulado negativamente por H-NS y su expresión se detecta en medio mínimo (Gallego-Hernandez *et al.*, 2012). Estudios recientes en *Salmonella*, han determinado que la proteína STY3070 corresponde al producto del gen *casC*, perteneciente al sistema CRISPR/Cas, cuya expresión es reprimida por Lrp (Leucine-responsive regulator protein) y se detecta en medio mínimo, independiente de la presencia de LeuO (Medina-Aparicio *et al.*, 2011). El sistema CRISPR/Cas en *Escherichia coli* se ha descrito que esta involucrado en la replicación, recombinación y reparación del ADN, y se ha propuesto que podría ser un mecanismo de defensa muy antiguo en bacterias y arqueas ya que confiere resistencia contra la invasión de fagos (Barrangou *et al.*, 2007). Además, LeuO actúa como antagonista de la represión de H-NS sobre este sistema en *Escherichia coli* (Westra *et al.*, 2010).

OmpX es una proteína de membrana externa, homóloga a las proteínas PagC, Rck y Ail de *Salmonella* y *Yersinia*, respectivamente. En una mutante en *ompX* se incrementa la tolerancia a SDS (sodium dodecyl sulfate) y a ciertos antibióticos, por lo que parece está involucrada en el transporte de compuestos hidrofóbicos a través de la membrana (Mecsas *et al.*, 1993, Mecsas *et al.*, 1995, Stancik *et al.*, 2002, Otto & Hermansson, 2004). Tpx es una tiol peroxidasa, enzima antioxidante del periplasma que se induce durante la fase exponencial de crecimiento y la formación de biopelícula (Kim *et al.*, 2006). OmpX y Tpx están involucradas en la resistencia a diferentes pH (Stancik *et al.*, 2002). STY1978 que se reprime en presencia de LeuO, ésta anotada como una proteína hipotética, hasta ahora no se la ha asociado a ninguna función o proceso celular (Hernandez-Lucas *et al.*, 2008).

1.3.3 Condiciones de expresión de LeuO

En los fondos genéticos silvestre de *E. coli*, y *S. Typhi*, la expresión de *leuO* es reprimida por H-NS (datos no publicados). Sin embargo, la expresión de LeuO se detectó en un medio de cultivo con bajos niveles de fosfato (VanBogelen *et al.*, 1996). Además, la expresión del gen *leuO* se ha podido detectar cuando la bacteria es crecida en medio mínimo sin leucina, isoleucina y valina, principalmente en la fase estacionaria. A pesar de la asociación con la fase estacionaria, la expresión de *leuO* no depende de *rpoS*; sin embargo, su expresión se ha asociado a la presencia de la molécula guanosin 3'-5'-bispirofosfato (ppGpp) que es una señal de estrés en la vía de respuesta estricta a nutrientes en la fase estacionaria de crecimiento (Fang *et al.*, 2000). También se demostró que LeuO se requiere para la restauración del crecimiento después de dos horas de retraso en un medio mínimo sin isoleucina, valina y leucina (Majumder *et al.*, 2001). Recientemente, se reportó que la expresión de LeuO es activada y reprimida por un complejo proteico formado por RcsB y BglJ en *E. coli* (Stratmann *et al.*, 2012).

1.3.4 Función de LeuO *in vivo*

No obstante, que la expresión de LeuO es muy baja en condiciones estándar de laboratorio, se ha encontrado que en *S. enterica* mutantes en el gen *leuO* ya sea en el modelo de infección en ratón o en *Caenorhabditis elegans*, se encuentran afectadas en los estadios iniciales de la invasión (Tenor *et al.*, 2004, Rodríguez-Morales *et al.*, 2006).

En *Vibrio cholerae* cepas mutantes en *leuO* están afectadas en la de formación de biopelículas; sin embargo, no están afectadas en la sobrevivencia en vida libre ni en la formación de monocapas en las superficies donde se desarrollan (Moorthy & Watnick, 2005). También, se encontró que la expresión de LeuO e induce en repuesta a dipéptidos cíclicos y a su vez LeuO regula negativamente a genes de virulencia (Bina *et al.*, 2013). Además, en *Vibrio cholerae* se ha reportado que además de reprimir a *cadC*, LeuO incrementa la sensibilidad a los ácidos orgánicos independiente del sistema *cad* (Ante *et al.*, 2015a).

Se encontró que ToxR, el regulador principal de virulencia *Vibrio cholerae*, regula positivamente la expresión de *leuO*, y LeuO reprime la expresión de AphA, reprimiendo indirectamente la producción de varios factores de virulencia en respuesta a condiciones ambientales como sales biliares. Se encontró que la transcripción de *leuO* se induce en presencia de sales biliares, así mismo una mutante de *leuO* muestra un incremento en la sensibilidad a las sales biliares, esto dependiente de ToxR, lo que sugiere que estos dos reguladores trabajan en conjunto para resistir a la bilis (Ante *et al.*, 2015b).

En estudios en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium demostraron que la activación de la transcripción de *leuO* reprime la expresión de genes de SPI-1 además, inhibe la invasión de las células epiteliales. LeuO es capaz de reprimir a genes de virulencia de manera indirecta, es decir mediante la inducción de la transcripción de *hilE* y la otra es por una vía independiente de HilE. HilE es un regulador codificado fuera de la SPI-1 que reprime la expresión *hilD*; HilD es una de los reguladores transcripcionales codificados en SPI-1, regula positivamente la expresión de otros genes en la isla de patogénesis (Fahlen *et al.*, 2000, Lostroh & Lee, 2001). Se ha sugerido que la represión que LeuO ejerce sobre los genes de SPI-1 podría ocurrir bajo condiciones donde H-NS, por razones que aún no se conocen, ya no es capaz de reprimir la expresión de estos genes (Espinosa & Casadesus, 2014).

Por lo anterior, se sugiere que la expresión de LeuO podría estar asociada a la respuesta a estrés y se ha considerado que puede ser importante en la sobrevivencia de la bacteria en condiciones limitantes, tanto en la vida libre como en el hospedero.

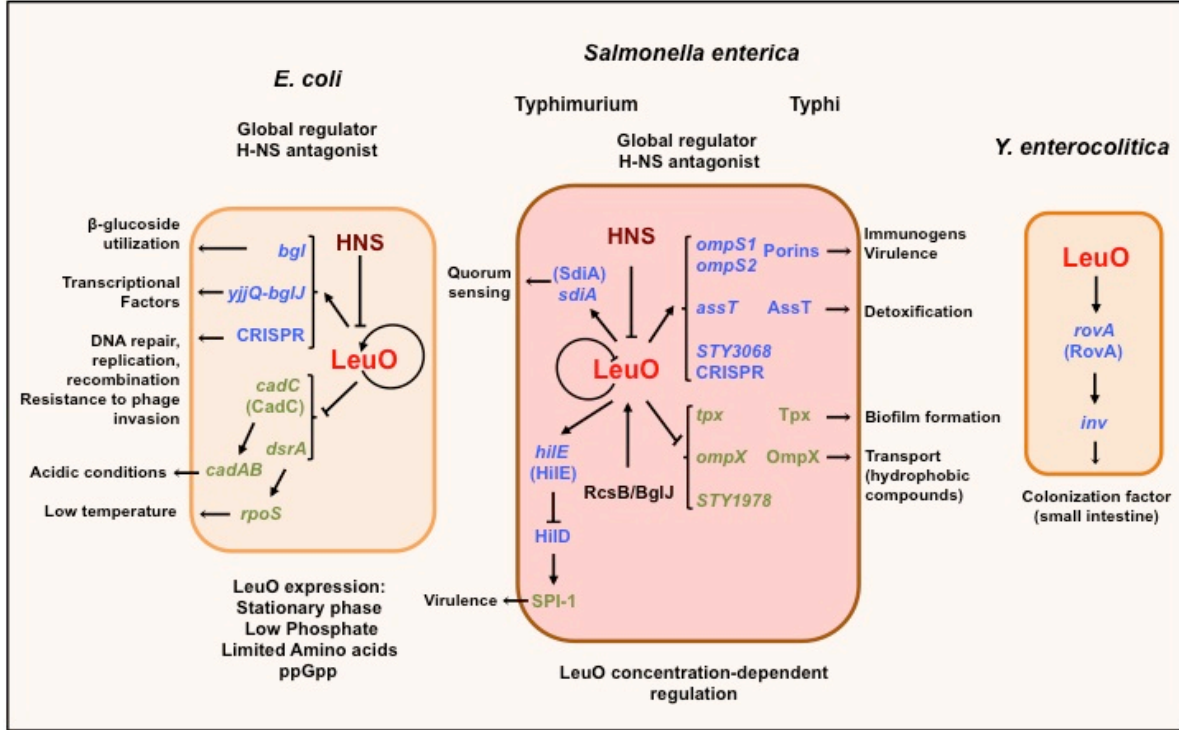


Fig. 7. Esquema de los genes regulados por LeuO en diferentes Enterobacterias. LeuO es un regulador dual, que induce (flechas) y también reprime (líneas) la expresión de varios genes involucrados en diferentes procesos celulares (señaladas por las flechas pequeñas), en *Escherichia coli*, *S. entérica* serovares Typhimurium, Typhi, y en *Yersinia enterocolitica*. En algunos casos donde reprime la expresión se ha propuesto que actúa como un backup de H-NS; sin embargo en varios casos LeuO actúa como un desrepressor, capaz de desplazar H-NS. Sin embargo, debido al incremento en el número de genes regulados por LeuO se ha propuesto como un regulador global y antagonista de H-NS en *E. coli* y *S. entérica* serovar Typhimurium. Además la expresión de *leuO* es reprimida por H-NS, pero en *E. coli* se ha detectado que su expresión se induce en condiciones de estrés. En *Salmonella* se ha observado que LeuO es capaz de regular diferencialmente la expresión genética dependiendo de su concentración en la célula (Guadarrama *et al.*, 2014b).

2. ANTECEDENTES

2.1 LeuO en *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*)

El gen *leuO* de *S. Typhi* codifica para una proteína de 314 aminoácidos, también se encuentra entre los operones *leuABCD* y *ilvIH*. LeuO es un regulador dual, reprime e induce la expresión de un gran número de genes; principalmente involucrados en la respuesta a estrés además, la misma expresión de LeuO se ha relacionado con condiciones extremas tanto en vida libre como en el hospedero (Hernandez-Lucas & Calva, 2012). Sin embargo, hasta el momento no se conoce el co-inductor al cual pudiera responder si es que requiere alguno, principalmente en vida libre.

2.2 El regulador LeuO es un antirrepresor

Se ha demostrado que LeuO se une al ADN *in vitro*, en la regiones reguladoras de los genes regulados, tanto positiva, como negativamente. No obstante, hasta el momento no se ha determinado una secuencia consenso, aunque se sabe que LeuO se une a regiones ricas en AT (Hernandez-Lucas *et al.*, 2008). Recientemente se ha propuesto que podría tener afinidad por secuencias intragénicas y que en algunos de sus probables sitios blanco se sobrepone con sitios de unión de la ARN polimerasa (Dillon *et al.*, 2012), sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado interacción de LeuO con ARN polimerasa para activar la transcripción. La mayoría de los estudios relacionados con el mecanismo de regulación de LeuO, se han realizado sobre los genes donde actúa de manera positiva, es decir, donde dicho regulador promueve la transcripción. Se ha demostrado que, en *S. Typhi*, LeuO actúa como antirrepresor más que como un activador en los genes *ompS2* (Fernandez-Mora *et al.*, 2004) y *ompS1* (De la Cruz *et al.*, 2007). En el caso de *ompS1*, H-NS reprime su expresión (Flores-Valdez *et al.*, 2003) y se demostró que LeuO desplaza al represor H-NS de la región reguladora de *ompS1* permitiendo así que el activador OmpR active la transcripción (Fig. 8), (Fernandez-Mora *et al.*, 2004, De la Cruz *et al.*, 2007).

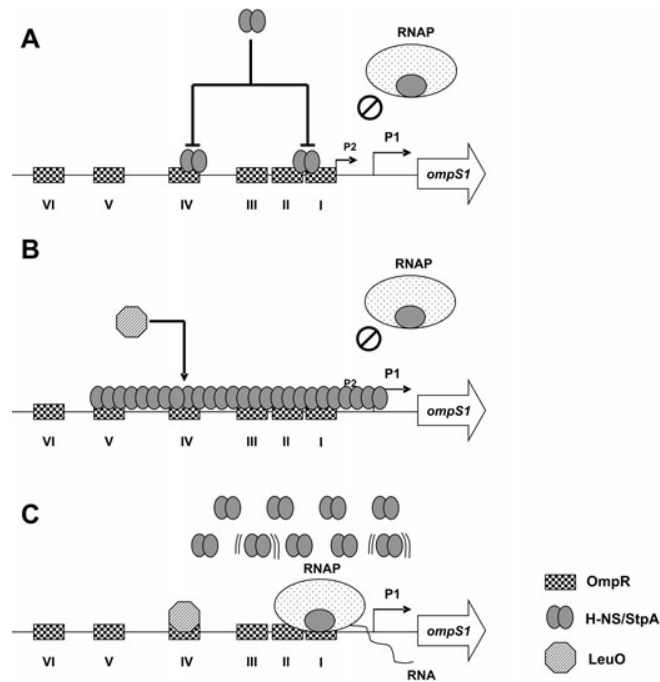


Fig. 8. Modelo del mecanismo regulación de LeuO como antirrepressor en el gen *ompS1* en *S. enterica* serovar Typhi. Se muestra la región reguladora de *ompS1*, los promotores P1 y P2, las seis cajas de unión de OmpR. A) Unión de H-NS a los dos sitios de nucleación en las cajas de unión de OmpR I y IV. B) polimerización de H-NS lo que impide el acceso a la ARN polimerasa. C) Unión de LeuO al sitio I, lo que resulta en el desplazamiento de H-NS y la des-represión de la transcripción (De la Cruz *et al.*, 2007).

En el modelo del “mecanismo de relevo de promotor”, participa el super-enrollamiento local del ADN, H-NS, LeuO y Lrp (Fang & Wu, 1998b, Fang & Wu, 1998a). En este modelo, en condiciones de limitación de nutrientes, Lrp activa al promotor de *ilvIH*, lo que conduce a un cambio en el super-enrollamiento del ADN, donde se expone la región reguladora de *leuO*, permitiendo así su transcripción. A su vez, LeuO delimita la extensión de H-NS hacia su promotor (lo que sugiere una autorregulación positiva) y al del operón *leuABCD*, contrarrestando así la represión (Fig. 9), (Chen *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 2003, Chen & Wu, 2005, Chen *et al.*, 2005).

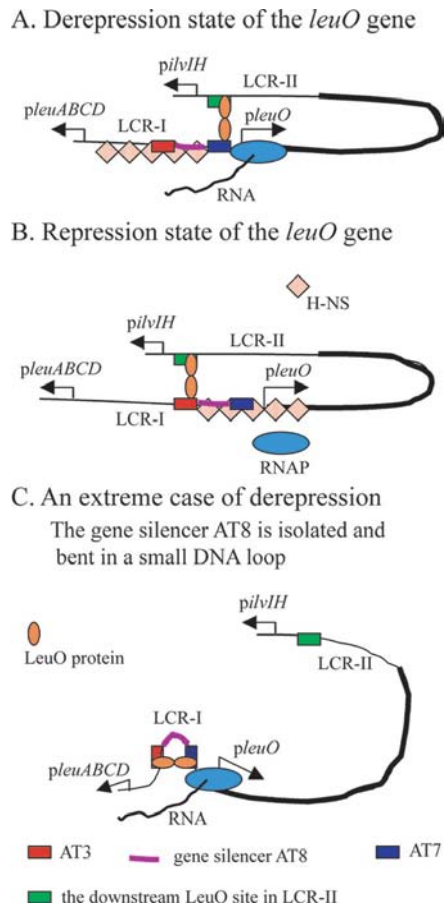


Fig. 9. Modelo de regulación de LeuO, “mecanismo de relevo de promotor”. Mecanismo de regulación de *leuO* que involucra la dinámica de “looping” en el DNA provocado por la posible interacción de LeuO-LeuO. La afinidad de unión de LeuO a los sitios AT7 –AT3, río debajo del sitio de unión LCR-II, uno de los tres sitios de unión de LeuO en el grupo de genes *ilvIH-leuO-leuABCD*, puede ser determinante para la frecuencia y estabilidad de formación de los “loops en el ADN” durante la expresión genética de este grupo de genes. También la competencia de unión por el sitio de unión LCR-II que se sobrepone con los sitios de unión de Lrp, el regulador positivo del operón *ilvIH*. A) Lrp podría ayudar a la unión de LeuO al sitio LCR-II, lo cual explicaría la transcripción de *leuO* cuando está activada la transcripción de *ilvIH*, localizada 1.5 kb río abajo como primer paso en mecanismo de relevo de promotor.

Hasta el momento, únicamente en los estudios del “mecanismo de relevo de promotor” es donde se ha propuesto que LeuO requiere de la formación de oligómeros para unirse en su propia región reguladora y ejercer su función al (Chen *et al.*, 2003, Chen & Wu, 2005). Además, por predicción de sitios de unión al ADN en *S. Typhimurium*, se ha sugerido que coincide con los sitios a los cuales se unen los LTTRs que han mostrado formar tetrámeros (Dillon *et al.*, 2012).

2.3. Oligomerización de los LTTRs y el extremo carboxilo

Se ha mencionado que el extremo carboxilo de los LTTRs está relacionado con la unión y respuesta al co-inductor, sin embargo también existen datos que sugieren que además tiene una función importante en la formación de oligómeros. De acuerdo a lo anterior, para algunos LTTRs que forman tetrámeros como NahR, CysB y OxyR y CysB; se ha observado que remociones en el extremo carboxilo de 9, 16 o 22 residuos, afectan principalmente su capacidad de reprimir la transcripción y de unirse al ADN, debido a defectos en la oligomerización (Shell, *et al* 1990; Jourdan y Stauffer 1998; Kullik, *et al* 1995; Lochowska, *et al* 2001). Mutantes puntuales en OxyR (E225K y A233V) y CysB (A227D), ubicadas en el extremo carboxilo, pierden la capacidad de reprimir, sin embargo conservan la capacidad de activar la transcripción pero no responden al co-inductor, lo que las convierte en activas constitutivas. También, se observó que estas mutantes pierden la capacidad de formar tetrámeros, aunque se unen a ADN como dímeros (Kullik, *et al* 1995; Lochowska, *et al* 2001).

Por otro lado, para MetR y Nac, se determinó que forman dímeros y ciertas remociones en su extremo carboxilo no afectan de manera drástica su función transcripcional, ya que la mayoría de las proteínas con remociones fueron capaces de activar o reprimir a niveles similares de la proteína silvestre. Esto sugiere que estas proteínas incompletas se unen al ADN y que conservan la capacidad de dimerizar, esto último puede deberse a que no se afectó su LH, involucrada con la formación de dímeros (Maxon *et al.*, 1990, Muse & Bender, 1999, Muraoka *et al.*, 2003, Zhou *et al.*, 2010).

3. HIPÓTESIS:

LeuO de *S. Typhi* requiere al menos de su extremo carboxilo para formar oligómeros, lo cual es importante para ejercer sus funciones como regulador transcripcional. Además, el dominio de unión a ADN (DBD) y la región central podrían ser importantes para la formación de oligómeros.

4. OBJETIVO GENERAL:

Determinar el estado oligomérico del regulador LeuO de *S. Typhi*, así como el efecto de mutaciones en el dominio de unión a ADN, región central, y remociones en el dominio carboxilo, en la formación de oligómeros y en su función reguladora.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar el estado oligomérico del regulador LeuO mediante la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad y posteriormente, por cromatografía de exclusión molecular.
- Realizar mutagénesis sitio dirigida en los dominios de unión a ADN y el subdominio RDI central y carboxilo terminal
- Realizar remociones en el extremo carboxilo de LeuO.
- Evaluar si las mutantes están afectadas en oligomerización.
- Analizar las diferentes mutantes de LeuO en su capacidad de inducir o reprimir la expresión de *ompS1* y *tpx*, respectivamente.
- Determinar la capacidad de unión al ADN de las mutantes puntuales y de las proteínas con remociones en el extremo carboxilo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo se enlistan en la tablas 1, 2 y 3, respectivamente. Los cultivos con las diferentes cepas bacterianas se crecieron en un pre-cultivo de LB a 37°C, en agitación por aproximadamente 12 horas. Posteriormente, los cultivos fueron lavados y homogenizados en PBS hasta una $DO_{590} = 1.0$, y se utilizaron para inocular en matraces con 100 mL de medio LB o Medio Nutritivo (MN) a 37°C en agitación a 200 rpm. En cada cultivo se agregaron los antibióticos correspondientes a las concentraciones especificadas en la Tabla 4.

5.2 Transformación de las cepas bacterianas

Las bacterias se prepararon para ser electrocompetentes y se utilizaron para transformar con los diferentes plásmidos utilizados en este trabajo. Para comprobar la presencia de los plásmidos recombinantes, a las clonas candidatas se les extrajeron los plásmidos por medio de la técnica de lisis alcalina (Miniprep). Los procedimientos se realizaron de acuerdo a los descritos en Guadarrama, C., 2007.

5.3 Construcción de las mutantes puntuales

Las diferentes mutantes en el dominio de unión a DNA o RDI (subdominio central y terminal) de LeuO, se generaron por mutagénesis sitio-dirigida, sustitución en un solo nucleótido mediante la técnica de oligonucleótidos sobrepuestos (Ito, W, *et al.*, 1991). Para generar las sustituciones por alanina en los residuos L27, L46, S54, L60, T79, P139, S310, V311, C312, K313 y R314, conteniendo una etiqueta de 6 histidinas, los fragmentos de ADN se generaron mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR (por sus siglas en inglés), utilizando como molde el plásmido pFM*TrcleuO*-50 (Tabla 2). En una primera ronda se utilizaron los pares de oligonucleótidos correspondientes para cada mutante, los fragmentos obtenidos para cada mutante se purificaron y se mezclaron, siendo el molde en una segunda ronda de PCR utilizando los oligonucleótidos en común *Trc99ACG3'* y *Trc99ACG5'* (Tabla 3).

Los fragmentos conteniendo los genes completos para cada mutante fueron digeridos con las enzimas de restricción *NcoI* y *BamHI* y fueron clonados mediante reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligasa (Promega), en el vector de sobreexpresión pFM*Trc12*, digerido también con *NcoI* y *BamHI*. Se generaron los diferentes plásmidos pLeuOL27A, pLeuOL46A, pLeuOS54A, pLeuOL60A, pLeuOT79A, pLeuOP139A pLeuOS310A, pLeuOV311A, pLeuOC312A, pLeuOK313A y pLeuOR314A.

5.4 Construcción de las mutantes con remociones en el extremo carboxilo

Para la construcción de las mutantes con remociones de 5, 10, 15, 20, 30 y 100 aminoácidos en el extremo carboxilo LeuO, conteniendo una etiqueta de 6 histidinas, se utilizó la técnica de PCR utilizando como templado el plásmido pFM*TrcleuO-50*, para generar los fragmentos a partir del gen *leuO* completo, se utilizaron los oligonucleótidos correspondientes para cada remoción y el común *Trc99ACG5'*. Los diferentes fragmentos fueron digeridos con las enzimas *NcoI* y *BamHI* y se clonaron en el vector de sobre expresión pFM*Trc12*, generando los plásmidos: pLeuO1-309, pLeuO1-304, pLeuO1-299, pLeuO1-294, pLeuO1-284, pLeuO1-214.

Para generar los plásmidos utilizados en el sistema genético basado en LexA, los fragmentos se obtuvieron por PCR con los oligonucleótidos LeuO-*Bgl* y LeuO-*RKpn* y se utilizó como templado los plásmidos correspondientes para LeuO silvestre y cada mutante puntual: pFM*TrcleuO-50*, pLeuOL27A, pLeuOL46A, pLeuOS54A, pLeuOL60A, pLeuOT79A, pLeuOP139A pLeuOS310A, pLeuOV311A, pLeuOC312A, pLeuOK313A y pLeuOR314A; y para las diferentes remociones: pLeuO1-309, pLeuO1-304, pLeuO1-299, pLeuO1-294, pLeuO1-284, pLeuO1-214. Los fragmentos obtenidos y así como el vector pSR658A fueron digeridos con las enzimas *BglIII* y *KpnI* y se hizo la clonación mediante la reacción de ligación en pSR658A. Los plásmidos generados: pLexA-LeuOL27A, pLexA-LeuOL46A, pLexA-LeuOS54A, pLexA-LeuOL60, pLexA-LeuOT79A, pLexA-LeuOP139A, y pLexA-LeuOS310A pLexA-LeuOV311A pLexA-LeuOC312A, pLexA-pLexA-LeuOK313A, pLexA-LeuOR314A, pLexA-LeuO1-314 (silvestre), pLexA-LeuO1-309 pLexA-LeuO1-304 pLexA-LeuO1-299 pLexA-LeuO1-294 pLexA-LeuO1-284 pLexA-LeuO1-214; fueron utilizados para los ensayos de dimerización.

Para generar los plásmidos utilizados para la sobreexpresión de LeuO silvestre y las diferentes mutantes, los plásmidos que contienen los genes *leuO* silvestre y mutantes y fueron digeridos con las enzimas *NcoI* y *HindIII* para ser clonados en el vector pMPM-T6Ω el cual tiene el promotor *pBAD*, inducible por arabinosa, dando origen a los plásmidos pMPM*leuO*-1His (silvestre), pMPMLEuOL27A, pMPMLEuOL46A, pMPMLEuOS54A, pMPMLEuOL60A, pMPMLEuOT79A, pMPMLEuOP139A y pMPMLEuO1-299, pMPMLEuO1-284.

En todos los casos los plásmidos generados derivados de pFM*TrcleuO*-50, pSR658A, pMPM-T6Ω, fueron secuenciados en la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología para verificar la presencia del inserto así como la secuencia de nucleótidos correcta.

5.5 Expresión y purificación de LeuO y las mutantes por cromatografía de afinidad

Para sobreexpresar LeuO, el plásmido pMPM*leuO*-1His se introdujo en la cepa BL21 (DE3) pLysS (Tabla 1). La purificación de LeuO silvestre utilizada para los experimentos de cromatografía de exclusión molecular, se realizó en condiciones nativas como sigue: la cepa fue crecida en medio de cultivo LB (1 Litro) a 37°C hasta una $DO_{590}=0.6$. En este punto se añadió al cultivo 0.1% de arabinosa y el cultivo se incubó por 4 horas más, después de las cuales se cosecharon las células por centrifugación y se homogenizaron en el amortiguador 1 (50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 20 mM de imidazol). Una vez en el amortiguador las células se sometieron a lisis con ayuda de la Prensa de French. La proteína LeuO se purificó por cromatografía de afinidad usando una columna cargada con resina de agarosa Ni-NTA (QIAGEN). Se realizaron lavados en varios amortiguadores: 50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 20 mM de imidazol, lisozima (1mg/mL), tritón X-100 (1 %), variando la concentración de imidazol a: 80 mM de imidazol, 100 mM de imidazol, 150 mM de imidazol. Finalmente la proteína se desprendió con el amortiguador, 50 mM NaH_2PO_4 , 5 mM de β -Mercaptoetanol, 0.1% de Tween, 20 % de glicerol y 300 y 500 mM de imidazol según fuera el caso. La proteína se guardó a $-20^\circ C$ hasta su uso en ensayos posteriores. Para las mutantes LeuOL27A, LeuOL46A, LeuOS54A, LeuOL60A,

LeuOT79A, LeuOP139A, y las proteínas LeuO1-309, y LeuO1-284, así como para LeuO silvestre, se usaron las siguientes condiciones: las cepas se crecieron en 200 mL de LB a 37°C a 200 rpm por 2 horas, después de lo cual se agregó al cultivo 0.1% de arabinosa y fue incubado a 16°C por 20 horas, para que después las células fueron colectadas por centrifugación y homogenizadas en amortiguador de fosfatos. Posteriormente las células se sometieron a rompimiento por sonicación y se realizó la purificación en condiciones nativas descritas anteriormente.

La proteína LeuO silvestre fue purificada en condiciones desnaturalizantes de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente (De la Cruz *et al.*, 2007); sin embargo se realizaron las modificaciones descritas a continuación. La cepa fue crecida en medio de cultivo LB (1 Litro) a 37°C hasta una $DO_{590} = 0.6$ añadiendo en este punto 0.1% de arabinosa. El cultivo se incubó por 4 horas más, después las células se cosecharon por centrifugación y se homogenizaron en el amortiguador 8 M de urea, 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), y se sometieron a sonicación. Los sobrenadantes fueron usados para cromatografía de afinidad usando una columna cargada con resina de agarosa Ni-NTA (QIAGEN). Las fracciones con LeuO fueron seleccionadas por SDS-PAGE y fueron sometidas a diálisis a 4°C, con amortiguadores con concentraciones decrecientes de urea (4, 1 y 0.2 M) y finalmente se dializó en el amortiguador de almacenamiento descrito anteriormente para LeuO purificada en condiciones nativas.

5.6 Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel

Para el análisis de LeuO silvestre por cromatografía de exclusión molecular, se utilizó una columna con Sephacryl S-200 (Amersham Biosciences) la cual se equilibró en amortiguador 500 mM NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 . La determinación de la curva estándar se realizó con el estuche comercial de proteínas de peso molecular conocido (Sigma). Primero, se aplicó Azul de Dextrán que tiene una masa molecular de 2, 000,000 Da, y después se sometió la columna a un flujo de volumen constante de 1.2 ml/min de amortiguador 500 mM NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 . Se registró el volumen donde se marca el pico máximo de lectura a 280 nm producido por el Azul de Dextrán: este valor se tomó como el volumen de exclusión o volumen muerto de la columna (V_0). Posteriormente se inyectaron las proteínas

de peso molecular conocido y se registró el volumen de desprendimiento máximo, V_e , para cada una.

La curva estándar de la columna se realizó graficando los valores del factor V_e/V_o de cada una de las proteínas: estos valores se tomaron como variable independiente, contra la masa molecular de los marcadores como variable dependiente, en escala semi-logarítmica. Esta curva se utilizó para determinar el estado oligomérico de LeuO, para lo cual en la columna se inyectó la preparación de LeuO (muestra problema) y se registró el pico máximo de desprendimiento. Los valores se graficaron y el peso molecular de LeuO se obtuvo mediante la ecuación de la recta obtenida.

5.7 Electroforesis de proteínas por SDS-PAGE

La electroforesis SDS-PAGE de las proteínas se realizó en un sistema de electroforesis vertical (BioRad System). Se utilizaron geles a una concentración del 15% de poliacrilamida. Los geles se visualizaron mediante su tinción con azul de coomassie.

5.8 Geles de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE-NC)

Las proteínas purificadas fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 10 % en condiciones nativas con Tris-HCl pH 8.0, se sometieron a electroforesis a 20 miliamperios. Después de la electroforesis el gel se tiñó mediante la técnica de tinción con plata. Se incubó con metanol 40%, ácido acético 10% por una hora, posteriormente se incubó dos veces con metanol 10%, ácido acético 5% por media hora. Después se incubó por 10 minutos con solución fijadora 1 X (solución stock 10 X 5 gramos de dicromato de potasio, 1 mL de 70% de ácido nítrico), se lavó con agua. Se agregó 0.17% de nitrato de plata y se lavó con agua. Para revelar, se agregó solución de revelado de tiosulfato (15 gramos de carbonato de sodio, 0.5 ml de formaldehído al 37%, 0.2 mL de tiosulfato de sodio al 1%); después de que las bandas adquieren la intensidad deseada se detiene la reacción de revelado agregando ácido acético al 5%.

5.9 Ensayos de cambio de movilidad electroforética (“Electrophoretic Mobility Shift Assay”, EMSA)

Por la técnica por PCR con la enzima *Taq* (Altaezyme), se amplificaron los fragmentos de la región reguladora de *ompSI* contienen los sitios de unión de LeuO, F1 (oligonucleótidos 310b-1 y 310b-8), F2 (oligonucleótidos 310b-3 y 310b-8) y F+1 (oligonucleótidos 310-(+) y 310b-1); el fragmento del gen *ler* (oligonucleótidos *ler-Kpn* y *ler-15F*), utilizado como control negativo (CN). Se utilizaron como templado los plásmidos pRO310 y pTEPLer1 (Tabla 2 y Tabla 3). Para los EMSAs no radioactivos, los fragmentos de ADN se incubaron concentraciones crecientes de LeuO silvestre y diferentes mutantes purificadas, en el regulador de unión (Tris HCl pH 7.5 30 mM, NaCl 240 mM, EDTA 3 mM, β -mercaptoetanol 30 mM, DTT 3 mM, Glicerol 20 mM). Posteriormente, se aplicaron en geles de poliacrilamida nativa al 6% en TBE y se sometieron a electroforesis. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta, Alpha-Imager (Alpha Innotech).

El fragmento F+1 se etiquetó en el extremo 5' con (γ - 32 P) dATP con 3,000 Ci mmol^{-1}) (Amersham Corporation) con la cinasa de polinucleótidos (Invitrogen) y los fragmentos fueron purificados con un estuche de extracción de gel (QIAGEN). Los EMSAs se realizaron con la mezcla en 20 μl finales de: F+1 marcado radioactivamente, poly (dI-dC) como un competidor de ADN no específico, así como LeuO silvestre o las diferentes mutantes purificadas en concentraciones crecientes, las reacciones se incubaron por 20 minutos a 4°C, las cuentas finales fueron de 15,000 cpm (Fig. 12) y 20,000 cpm (Fig. 17). Posteriormente, fueron sujetos a electroforesis en geles de poliacrilamida nativa al 6% en el amortiguador Tris-boratos EDTA (TBE) (pH 8.0). Los geles fueron secados y analizados por auto radiografía para observar las bandas que emitieran radioactividad..

5.10 Inmunodetección (“western blot”)

Las diferentes cepas se cultivaron hasta una D.O=0.6 y se les agregó 1 mM de IPTG para inducir la expresión de las proteínas. Se tomaron las muestras y se sometieron a SDS-PAGE; después las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm de poro (Amersham) en una cámara de transferencia semi-húmeda (BioRad). La membrana

se bloqueó con leche semi-descremada al 5 % en el regulador PBS-Tween en agitación a 4°C. La membrana se lavó con amortiguador PBS-Tween y se incubó con el anticuerpo primario, anti-LeuO (1:500) y anti-LexA (1:2500); posteriormente, se incubó con la dilución 1:10,000 del anticuerpo secundario (anti-conejo y anti-ratón) acoplado a la peroxidasa (Biomeda). La membrana se reveló con el estuche comercial de quimioluminiscencia Chemi-Glow (Alpha Innotech) y se expuso a una película fotográfica a diferentes tiempos.

5.11 Ensayo de la actividad específica CAT

La actividad enzimática CAT de las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, se realizó creciendo las cepas que contuvieran los plásmidos en medio nutritivo MN, con IPTG (100 µM) para inducir la expresión de LeuO silvestre y mutantes. Se determinó la concentración de proteínas con el estuche comercial BCA (Pierce) y la actividad enzimática con acetil-CoA, cloranfenicol y 5,5 ditio-bis (2-ácido nitro benzoico) (DNTB, 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 µmol/mg/min.

5.12 Sistema de interacción proteína-proteína en bacterias basado en LexA

Para evaluar la dimerización de LeuO silvestre y de las diferentes mutantes generadas, se utilizó el sistema de interacción proteína-proteína de LexA. Se fusionó la proteína de interés al extremo amino de LexA (dominio de unión a una secuencia operadora), la cual en caso de dimerizar permite la formación de un dímero funcional de LexA, el cual reprime la expresión de una fusión cromosomal *sulA-lacZ* en la cepa SU101 (Dmitrova *et al.*, 1999). Los diferentes plásmidos se introdujeron en la cepa SU101 de *E. coli*. Además, como controles positivos de dimerización se utilizaron los plásmidos p658HNS y pler-1-123 (Bustamante y Medrano datos no publicados), respectivamente. Las muestras se procesaron para determinar la actividad de β-galactosidasa de acuerdo a lo reportado anteriormente (Oropeza *et al.*, 1999) y en Guadarrama, C., 2004.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis de la unión de LeuO al ADN (región reguladora de *ompSI*), purificada en condiciones nativas y desnaturizantes.

Se ha demostrado que LeuO es capaz de unirse a la región reguladora de sus genes blanco, en ensayos *in vitro*, en los denominados “footprinting assays” (pisadas o protección a DNAsa) y EMSA (“electrophoresis mobility shift assay”). Estos análisis se han realizado con LeuO purificada en condiciones nativas o en condiciones desnaturizantes (Fernandez-Mora *et al.*, 2004, De la Cruz *et al.*, 2007).

Para obtener LeuO, se utilizó la cepa BL21pLys (Tabla 1) transformada con el plásmido pMPMLeuO-His (contiene el gen *leuO* de *S. Typhi*) (Tabla 2). La expresión se indujo con arabinosa (1%). Posteriormente LeuO se purificó mediante condiciones desnaturizantes (LeuO-6xHis-DC) y condiciones nativas (LeuO-6xHis-NC), (Materiales y Métodos).

Para verificar la capacidad de LeuO-6xHis-DC y LeuO-6xHis-NC de unirse al ADN se realizaron EMSAs, con los fragmentos de ADN F1 y F2, de la región reguladora de *ompSI*, que contienen los dos sitios de unión de LeuO (De la Cruz *et al.*, 2007). Como control negativo (CN), se usó un fragmento de ADN de la región estructural del gen *ler* de *E. coli* enteropatogénica (EPEC), el cual se ha observado que no retarda en presencia de LeuO o de H-NS (Flores-Valdez *et al.*, 2003, De la Cruz *et al.*, 2007). Al analizar el EMSA realizado con LeuO-6xHis-DC no se observó ningún complejo de interacción proteína-ADN, incluso a concentraciones mayores de proteína. Esto contrasta con lo observado previamente, donde LeuO purificada en condiciones desnaturizantes se une a los fragmentos F1 y F2, (De la Cruz *et al.*, 2007); a las mismas concentraciones evaluadas en este estudio. Estos resultados sugieren que la preparación de LeuO obtenida en este estudio podría ser diferente a la obtenida anteriormente y por lo tanto no pudimos ver interacción. Por otro lado, al analizar LeuO-6xHis-NC se observa que se une eficientemente a ambos fragmentos F1 y F2, desde la concentración más baja de proteína y no se observa unión al control negativo (CN), (Fig. 10).

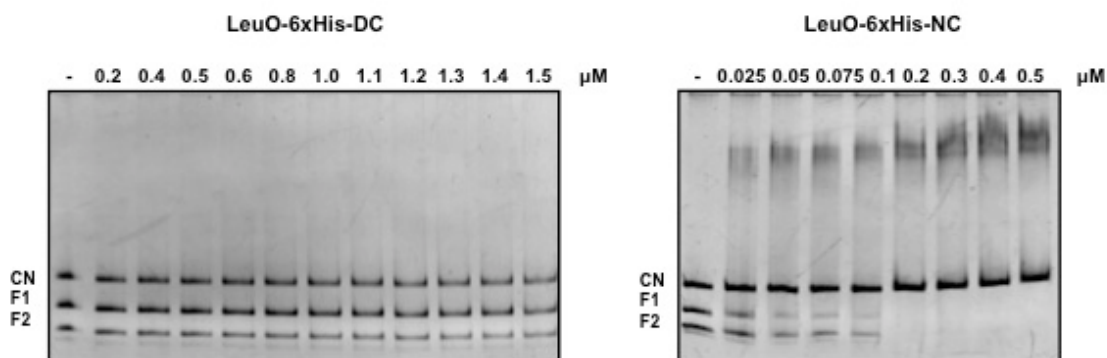


Fig. 10. EMSA con LeuO-6xHis-DC y LeuO-6xHis-NC. Unión de LeuO purificada en condiciones nativas y condiciones desnaturizante a los fragmentos F1 y F2 correspondientes a la región reguladora de *ompS1* de *S. Typhi* y CN correspondientes a la región estructural de *ler* de *E. coli*). Se muestran las concentraciones de LeuO-6xHis-DC y LeuO-6xHis-NC utilizadas, de manera creciente de izquierda a derecha (μM).

6.2 LeuO de *S. Typhi* forma tetrámeros en solución

Con base en los datos anteriores, se decidió purificar LeuO en condiciones nativas para determinar la clase de oligómeros que forma en solución, utilizando cromatografía de exclusión molecular (Materiales y Métodos). Previamente se obtuvo la curva de calibración, utilizando un estuche con varias proteínas de pesos moleculares conocidos (PM, kDa) y Blue de Dextran (2000) para determinar el volumen muerto (V_0). Posteriormente, registramos el volumen de elución (V_e) de las diferentes proteínas estándares (Tabla 6).

La curva de calibración (Fig. 11 A), se realizó con el ajuste de los datos obtenidos y mediante regresión lineal se obtuvo la ecuación de la recta: $y = 6922.1e^{(-3.0248x)}$

Proteínas	PM (kDa)	Ve (ml)	Ve/Vo
Azul Dextran	2000	90	1.0
β-amilasa	200	108	1.2
Alcohol deshidrogenasa	150	117	1.3
Albúmina	66	129	1.43
Anhidrasa carbónica	29	167	1.86
Citocromo C	12.4	187	2.08

Tabla 1. Pesos Moleculares de proteínas conocidas, PM (kDa), el volumen de elusión (V_e) donde se registra el pico máximo de elusión y el factor V_e/V_o , donde V_o es el volumen muerto de la columna o volumen de exclusión determinado por el pico de desprendimiento del Azul de Dextrán (detectado a 280 nm).

Posteriormente se analizó la proteína LeuO por duplicado: en ambos experimentos se observó un solo pico de desprendimiento y se registró el V_e de 118 y 114 mL, respectivamente (116 mL, promedio), donde la relación $V_e/V_o = 1.28$ (Fig. 11 B). Este dato se agregó a la curva de calibración (Fig. 11 A), y con este valor se obtuvo el peso molecular aparente (PMA) o RMM (Relative Molecular Mass) de LeuO mediante la siguiente ecuación:

$$PMA_{LeuO} = 6922.1 e^{(-3.0248)*} (1.28)$$

$$PMA_{LeuO} = 140.75 \text{ kDa}$$

Con el valor PMA de LeuO y con la siguiente relación: RMM/35.7 (kDa), siendo el valor último el peso molecular del monómero, se obtuvo que LeuO-6XHis-NC consta de 4 subunidades (Fig. 11 B). Por lo tanto LeuO forma tetrámeros en solución.

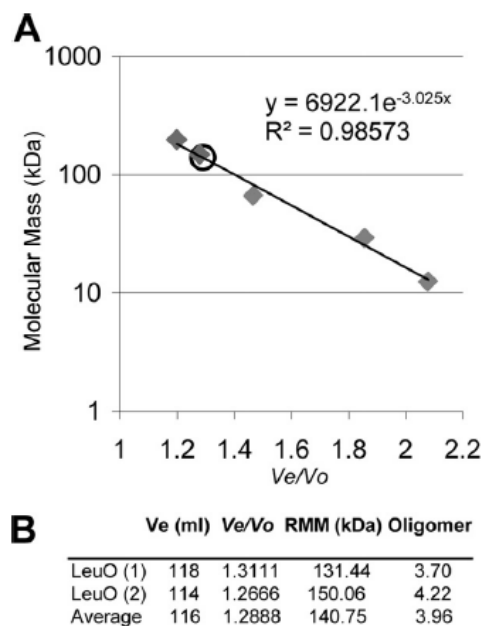


Fig. 11. Cromatografía de exclusión molecular de LeuO. LeuO silvestre purificada en condiciones nativas (2µg/3ml) fue analizada en una columna de Sephacryl S-200: **(A)**, curva de calibración obtenida con los valores de los logaritmos de los pesos moleculares de las proteínas estándares versus sus valores (Ve/Vo) respectivos. **(B)**, valores Ve y Ve/Vo de las muestras de LeuO obtenidos y el promedio de dos experimentos independientes; el PMA para LeuO se incorporó a la curva estándar (circulo).

6.3 Análisis de LeuO, purificada en condiciones nativas y desnaturalizantes por PAGE en condiciones nativas

Con la finalidad de determinar las diferencias entre las preparaciones de proteína LeuO-6XHis-NC y LeuO-6XHis-DC, estas se analizaron en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE-CN), y tenidos con la técnica de tinción con plata (Materiales y Métodos). Al analizar LeuO-6XHis-NC, se observa una sola banda muy intensa (Fig. 12 A), la cual corresponde al tetrámero. Esto de acuerdo a los resultados del experimento de cromatografía de exclusión molecular (Fig. 11), donde solo se observó un punto de elusión

y no se registró otra señal, que correspondiera a otras formas de la proteína (dímero o monómero).

Por otro lado, al analizar a LeuO-6XHis-DC, se observaron otras bandas muy intensas que migraron más rápido en el gel nativo, comparadas con la banda que corresponde al tetrámero de LeuO-6XHis-NC (Fig. 12 A), las cuales parecen ser otras formas oligoméricas de LeuO. Esto se confirmó al analizar las preparaciones, LeuO-6XHis-NC y LeuO-6XHis-DC por SDS-PAGE, teñidos con Coomassie (datos no mostrados) y por western-blot, con un anticuerpo anti-His; donde se observó una sola banda que corresponde al monómero de LeuO de 35.7 kDa (Fig. 12 B). Lo anterior comprueba principalmente para la preparación de LeuO-6XHis-DC que las bandas observadas por PAGE-NC no son productos de degradación.

6.4 El tetrámero de LeuO se une al ADN

Debido, a que no se observó unión al ADN con LeuO-6XHis-DC y con la finalidad de analizar con mayor detalle las diferencias en la unión al ADN de LeuO-6XHis-NC (tetrámero) y de LeuO-6XHis-DC (diferentes formas oligoméricas), se realizaron EMSAs utilizando una sonda radioactiva para obtener mayor sensibilidad. Se utilizó el fragmento F+1 de la región reguladora del gen *ompS1* de *S. Typhi* (Fig. 12 C), el cual contiene la región promotora así como los sitios de unión de LeuO (De la Cruz *et al.*, 2007). Como se muestra en la Fig. 12 D, LeuO-6XHis-NC se une al fragmento F+1 desde 0.050 μ M, además, se observa que todo el fragmento se retarda a una concentración de 0.6 μ M de LeuO. Por otro lado, este ensayo permitió observar que LeuO en la preparación LeuO-6XHis-DC se une al ADN, sin embargo se requiere de 10 veces más proteína para retardar el mismo fragmento de ADN retardado con LeuO-6XHis-N (Fig. 12 E y F). Debido a la sensibilidad del ensayo en ambos EMSAs se observó otra banda que también es retardada, en su movilidad sin embargo, no parece corresponder al complejo LeuO-ADN.

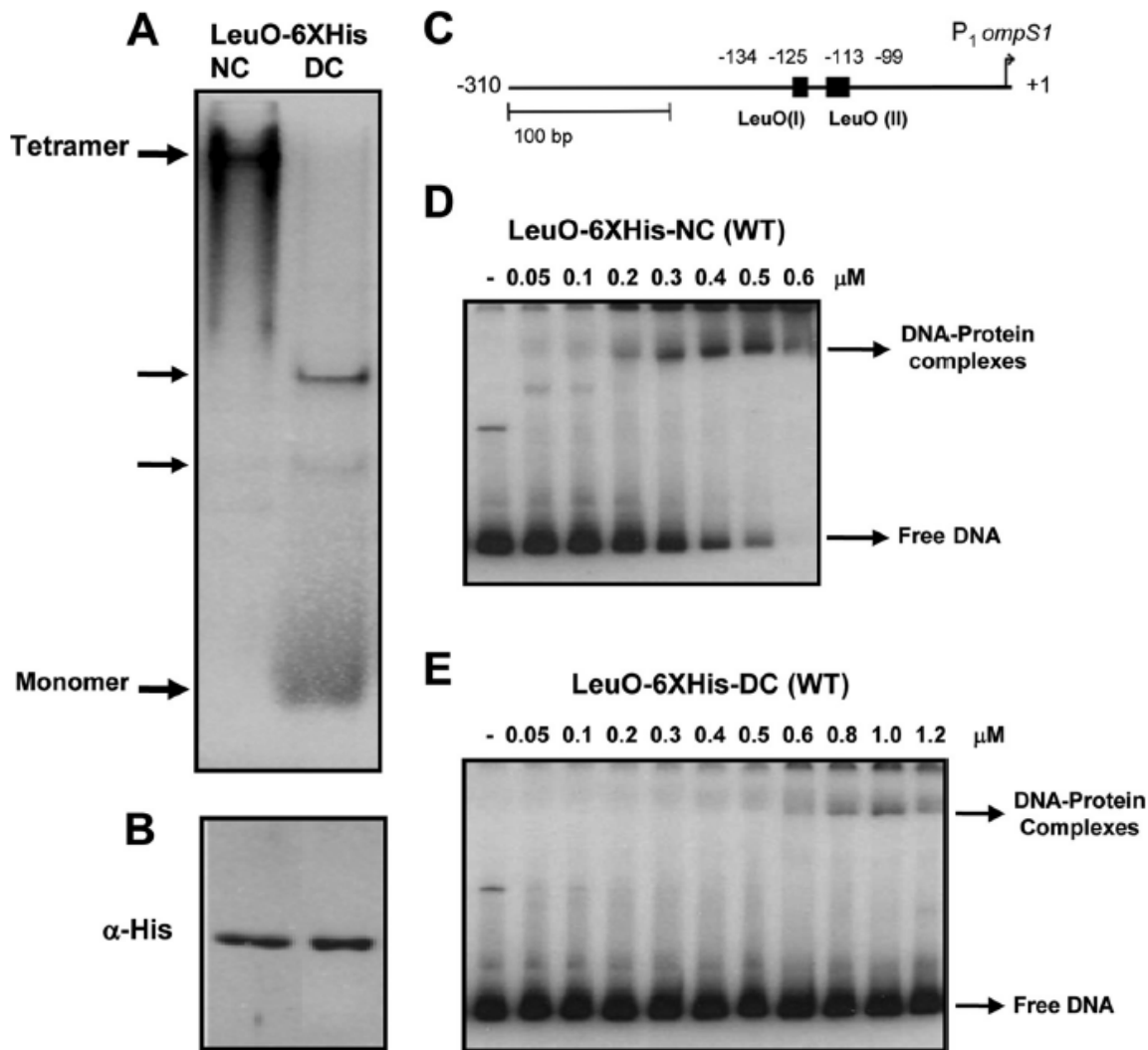


Fig. 12. El tetrámero de LeuO se une a ADN con mayor afinidad. (A), análisis de LeuO (1.5 μg por línea) en PAGE-NC (electroforesis en condiciones nativas en gel de poliacrilamida al 10 %); purificada en condiciones nativas (LeuO6xHis-NC) y condiciones desnaturalizantes después de la diálisis (LeuO-6xHis-DC). (B), western blot anti-His, después de SDS-PAGE. (C), Esquema del fragmento F+1, de la región reguladora del gen *ompS1* de *S. Typhi*. (D y E), EMSAs con el fragmento F+1 marcado con P-32 y concentraciones crecientes de LeuO6xHis-NC (Tetrámero) y LeuO-6xHis-DC (probables formas: Monómero>Dímero>Trímero>Tetrámero).

6. 5 Diferentes formas oligoméricas de LeuO en la preparación LeuO6x-His-DC

Debido a que al analizar LeuO-6XHis-DC en el gel nativo se podía observar una banda a la altura donde migra el tetrámero de LeuO, la cual es de baja intensidad (Fig. 12 A); se realizaron otros geles nativos y en la preparación de LeuO-6XHis-DC se puede apreciar claramente una banda que migra a la altura donde se observa el tetrámero de LeuO (Fig. 13 A). Estos resultados sugieren que en este experimento al purificar LeuO en condiciones desnaturalizantes, el proceso de diálisis permitió el replegamiento de la proteína y la formación de tetrámeros, aunque en proporciones muy bajas. Esto podría explicar porqué con esta preparación se observa unión al ADN, aunque se requiere mayor concentración, debido a que existe muy poco tetrámero. Estos datos sugieren que el tetrámero de LeuO es la forma oligomérica que se une al ADN con mayor afinidad a diferencia de las formas que se observan en LeuO-6XHis-DC purificada en condiciones desnaturalizantes. También existe la posibilidad de que las otras formas oligoméricas observadas en LeuO-6XHis-DC se unan al ADN, sin embargo, al parecer la afinidad es muy baja ya que se requiere de una mayor concentración de proteína para ver unión al ADN.

Debido a que en este estudio no se determinó por cromatografía de exclusión molecular la naturaleza oligomérica de las diferentes bandas observadas para LeuO6x-His-DC; se utilizó el análisis por geles nativos para comparar a LeuO6x-His-DC con la proteína Ler (Factor transcripcional de *E. coli* enteropatógena). Ler se ha caracterizado y se determinó que forma octámeros y dímeros en solución cuando es purificada en condiciones desnaturalizante (DC) y se observó la formación de octámeros cuando es purificada en condiciones nativas (NC), (Medrano-López *et al.*, en preparación).

El análisis por PAGE-NC de LeuO (35.7 kDa) y Ler (16 kDa), muestra que el tetrámero de LeuO presente en LeuO-6XHis-NC migra a la misma distancia que el octámero de Ler (128 kDa) (Fig. 13 A y B). Así mismo, en la preparación de LeuO-6XHis-DC, la banda que migra a la misma distancia que el tetrámero de LeuO también migra como el octámero de Ler. Al analizar a Ler purificada en condiciones desnaturalizantes (DC) se puede observar el octámero y además el dímero de Ler (32 kDa), el cual migra de manera similar a una de las bandas más abundantes de LeuO-6XHis-DC, la cual correspondería al monómero de LeuO (Fig. 13 B).

Más aún, al analizar a Ler silvestre (wt) y una mutante de Ler que forma tetrámeros (Ler mut, 64 kDa), ambas purificadas en condiciones nativas (NC), se puede observar el tetrámero en Ler silvestre (wt) y en la Ler mutante (mut): el tetrámero migra de manera similar a una de las bandas de menor intensidad observadas en LeuO-6XHis-DC (Fig. 13 C). Por lo tanto de acuerdo al peso molecular ésta banda podría corresponder al dímero de LeuO (75 kDa aproximadamente). Sin embargo, para corroborar lo anterior LeuO-6XHis-DC deberá someterse a análisis por cromatografía de exclusión molecular.

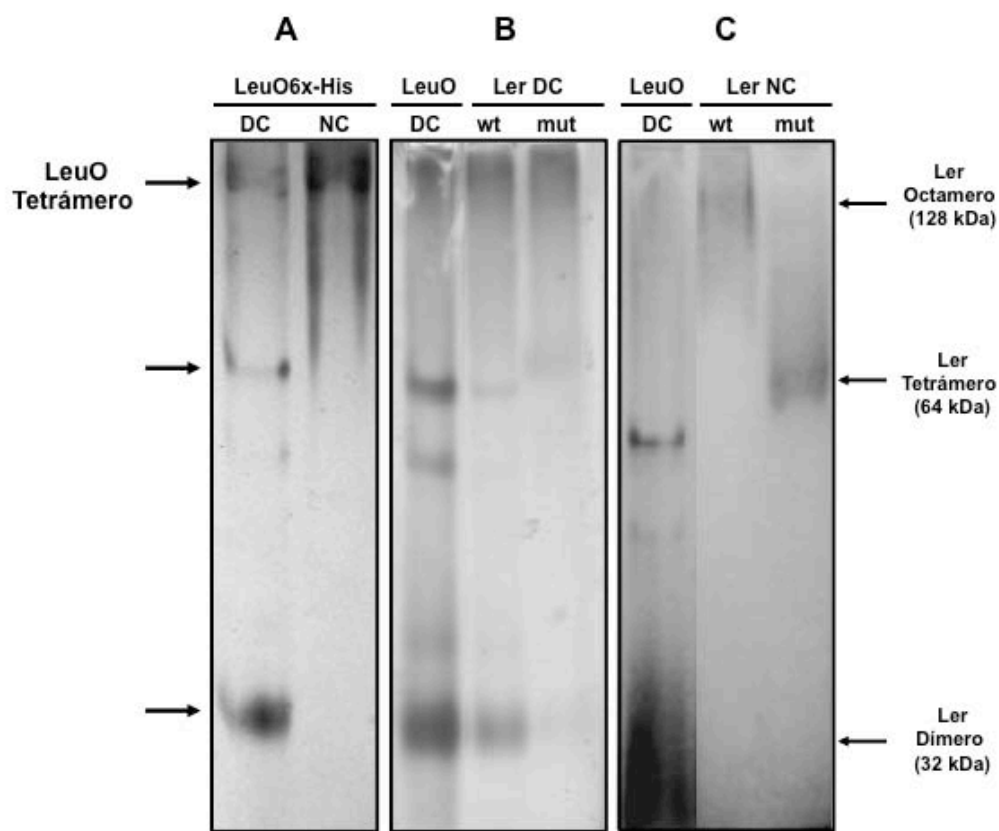


Fig. 13. Diferentes formas oligoméricas de LeuO6xHis-DC, comparación con Ler. Análisis por PAGE-NC (electroforesis en condiciones nativas en gel de poliacrilamida al 10 %): LeuO-6xHis-DC, LeuO-6xHis-NC (A). LeuO-6xHis-DC y Ler DC , (purificada en condiciones desnaturalizantes), monomero 16 kDa, dímero 32 kDa), (B). LeuO-6xHis-DC, Ler NC (purificada en condiciones nativas), Ler silvestre (wt) se observa el octámero (128 kDa) y en Ler mutante (mut) el tetrámero (64 kDa) (C). Las flechas indican las diferentes formas oligoméricas de las proteínas, cada carril se cargo con 1.5 μ g de proteína.

6.6 Residuos localizados en el DBD y LH de LeuO afectan la dimerización mientras que residuos en el RD-I no intervienen en la formación de oligómeros

El DBD, siendo la región más conservada entre los LTTRs, ha sido ampliamente estudiada documentándose que mutantes dentro de este dominio afectan la unión a ADN, así como la activación y represión transcripcional (Schell, 1993, Maddocks & Oyston, 2008). Sin embargo, mutaciones en el DBD en algunos miembros de la familia, como CysB, OxyR y GcvA, mostraron defectos para oligomerizar (Kullik *et al.*, 1995a, Jourdan & Stauffer, 1998, Lochowska *et al.*, 2001). Además, la hélice enlazadora (LH), también participa en la formación de dímeros y el subdominio RD-I localizado en la parte central de la proteína es una región menos conservada (Fig. 14), la cual está involucrada en la unión y la respuesta al co-inductor (Schell, 1993, Muraoka *et al.*, 2003, Sainsbury *et al.*, 2009, Zhou *et al.*, 2010).

Para iniciar la caracterización de los dominios de LeuO, se analizó la participación del DBD, LH y subdominio RD-I central en la oligomerización, para lo cual se realizaron sustituciones por alanina en seis de los residuos más conservados localizados en estas regiones (Figs. 14 y 15 A) y se fusionaron al gene *lexA*, para ensayos de dimerización mediante el sistema de interacción basada en LexA. El sistema basado en LexA fue desarrollado para analizar la dimerización de proteínas *in vivo*, usando la cepa reportera SU101 de *E coli*, la cual contiene la fusión reportera cromosomal *sulA::lacZ*, que cuenta con los operadores para LexA: de esta manera, la formación de dímeros se requiere para el reconocimiento de dichos operadores y así reprimir la transcripción (Dmitrova *et al.*, 1998, Daines & Silver, 2000). El DBD de LexA (residuos 1-128) se fusionó a la secuencia completa de LeuO de *S. Typhi* (residuos 1-314), y se usó como control positivo, debido a que se determinó que LeuO oligomeriza formando tetrámeros (Fig. 11). En la cepa SU101 con pSR658-A, los niveles de actividad de la enzima β -galactosidasa reflejan la expresión constitutiva de la fusión *sulA::lacZ*: este nivel fue tomado como el 100% de expresión de la fusión. Los resultados muestran que LexA-LeuO1-314 (silvestre), con niveles de expresión entre 5-10%, reprime eficientemente la expresión de *sulA::lacZ* (Fig. 15 B); por lo que LeuO puede reemplazar el dominio de dimerización de LexA.

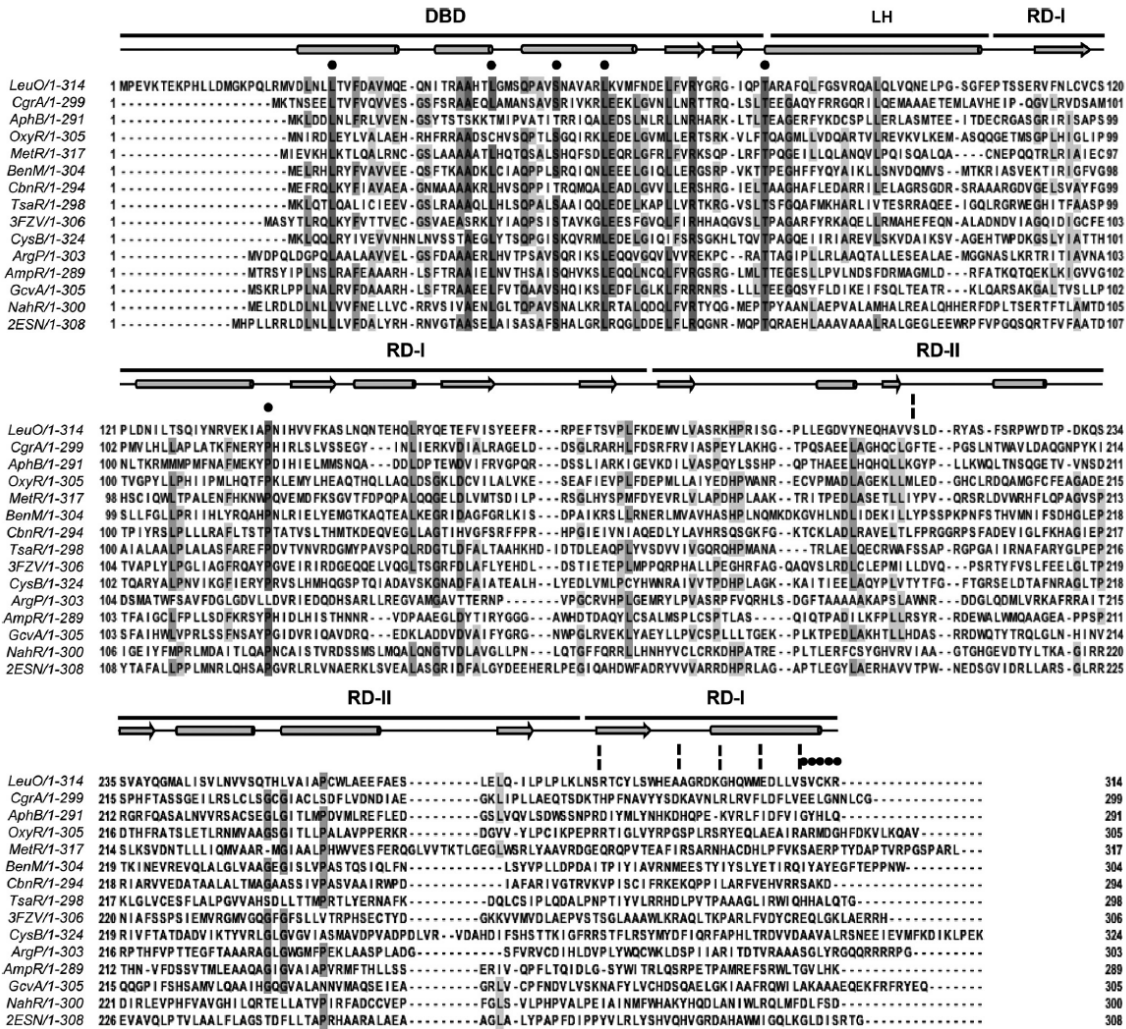


Fig. 14. Alineamiento múltiple de secuencias de varios LTRs caracterizados y LeuO. De acuerdo al alineamiento con otros LTRs el DBD de LeuO comprende del residuo 21 al 78, presentando una extensión de 20 residuos el extremo amino; LH abarca del residuo 79 al 105 y el RD del residuo 106 al 314. Los residuos sustituidos y las remociones están marcadas con círculos negros y líneas verticales segmentadas, respectivamente. El alineamiento y la predicción de estructura secundarias (hélices, cilindros; β -plegadas, flechas; y vueltas, líneas) de LeuO se realizaron con ClustalW y JalView (Clamp *et al.*, 2004): el grado de identidad se marca con diferentes tonos de gris. Representación esquemática de los dominios de los LTRs: Dominio de unión al ADN (DBD), hélice enlazadora (LH), Dominio Regulador, sub-dominios RD-I (central y terminal) y RD-II. Las secuencias de aa del alineamiento es la siguiente: LeuO (*S. enterica* serovar Typhi), CrgA (*N. Meningitidis*; GI:7188597), AphB (*V. Cholerae*; GI:5565924), OxyR (*E. coli*; GI:388479299), MetR (*E. coli* GI:388479422), BenM (*A. baylyi* ADP1; GI:2996626), CbnR (*R. Eutropha*, GI:4210464), TsaR (*C. testosteroni* T-2; GI:75499536), CysB (*E. coli* GI:1787530), ArgP (*M. tuberculosis* H37v; GI:15609122), AmpR (*C. freundii* GI:736669), GcvA (*E. coli*; GI:388478824), NahR (*P. Putida*; GI:37220701), PDB numero de acceso para 3FZV (*P. aeruginosa*; Q9I6S0) and 2ESN (*P. aeruginosa*; Q9I641).

Se realizaron las sustituciones: L27A (ubicada al inicio del DBD), L46A, S54A, L60A (ubicadas en el motivo HTH), T79A (ubicada al inicio de la LH) y P139A (localizada dentro del subdominio RD-I central) (Fig. 14 y 15 A). Los resultados muestran que las quimeras presentan defectos para reprimir la expresión de *sulA-lacZ*; mostrando niveles de expresión de 65% para LexA-L27A, 85% para LexA-L46A y LexA-L60A y del 50% para LexA-T79A (Fig. 15 B). Por otro lado, las quimeras LexA-S54A y LexA-P139A fueron capaces de reprimir la expresión de la fusión *sulA-lacZ* tan eficientemente como LexA-LeuO silvestre (Fig. 15 B). Se realizaron ensayos de western-blot, con extractos celulares conteniendo las fusiones LexA-LeuO silvestre y LexA-LeuO mutantes utilizando un anticuerpo anti-LexA, los cuales muestran la expresión de las proteínas quiméricas (Fig. 15 C). Estos ensayos revelaron que los residuos ubicados en el DBD y la LH de LeuO, L27, L46, L60 y T79 son importantes para la dimerización, mientras que los residuos S54 y P139, este último ubicado en el RDI, no afectaron la dimerización; por lo tanto el DBD y LH de LeuO parecen estar involucrados en la oligomerización.

Este sistema fue de gran utilidad para analizar la capacidad dimerización de las mutantes, debido a que la sobre expresión y purificación de las proteínas mutantes presento dificultades: se obtuvieron en bajas concentraciones y con pureza no apta para su análisis por filtración en gel, o por geles de poliacrilamida en condiciones nativas.

6.7 Las mutantes en el DBD, LH y RD-I (subdominio central) de LeuO, están afectadas en su función transcripcional

Con los resultados anteriores se decidió analizar las mutantes (Fig. 15 A), localizadas en el DBD, LH y RD-I (subdominio central), en su capacidad para activar o reprimir la transcripción. Los genes que codifican para LeuO silvestre y para las seis variantes fueron clonados en el plásmido pFMTrc12 (Materiales y Métodos), los plásmidos resultantes: pFMTrc*leuO*-50 (silvestre), pLeuOL27A, pLeuOL46A, pLeuOS54A, pLeuOL60A, pLeuOT79A y pLeuOP139A, fueron utilizados para transformar la cepa IMSS-1, conteniendo los plásmidos reporteros pKK232-9 (*ompS1*) o pKK232-9 (*tpx*), cuya expresión se induce o se reprime en presencia de LeuO (Hernandez-Lucas *et al.*, 2008). Los resultados presentados en la Fig. 15 D y 15 E, muestran que las mutantes L27A, L46A,

S54A, L60A y T79A, son proteínas completamente defectuosas para inducir o reprimir la expresión de las fusiones *ompSI::cat* o *tpx::cat*, respectivamente.

Sin embargo, la mutante P139A mostró un fenotipo distinto, en esta mutante se redujo diez veces su capacidad de inducir la transcripción de *ompSI* al compararla con LeuO silvestre (Fig. 15 D); mientras que fue capaz de reprimir casi en su totalidad la expresión de *tpx* (Fig. 15 E).

Para comprobar la expresión de las diferentes mutantes puntuales de LeuO, se realizó un ensayo de western-blot con extractos celulares de las cepas que expresan LeuO silvestre y las diferentes mutantes, utilizando un anticuerpo policlonal anti-LeuO. Como se puede observar en la Fig. 15 F, las mutantes, L46A, S54A, T79A y P139A se expresan a niveles similares a LeuO silvestre, mientras que L27A y L60A se expresaron a niveles más bajos.

Estos ensayos muestran que las mutantes L27A, L46A, L60A y T79A perdieron la capacidad de regular la transcripción, algo esperado dado que mostraron defectos en la formación de dímeros (Fig. 15 B). Por otro lado, la mutante S54A, la cual forma dímeros de manera tan eficiente como LeuO silvestre (Fig. 15 B), fue totalmente defectuosa para inducir o reprimir la transcripción (Fig. 15 D y 15 E). Es factible que esta mutante haya perdido su capacidad de unión a ADN, ya que el residuo Ser54 se localiza en el motivo HTH (Fig. 14 y 15A). La mutante P139A, la cual presenta un fenotipo por demás interesante, debido a que a pesar de dimerizar (Fig. 15 B) sólo induce la expresión de *ompSI* a niveles muy bajos, pero fue capaz de reprimir la transcripción de *tpx* casi en su totalidad (Fig. 15 D y 15 E); y se expresó en cantidades similares a LeuO silvestre (Fig. 15 F). Es muy probable que esta mutante mantenga la capacidad de unirse de manera eficiente a la región reguladora de *tpx*, pero se una con menor afinidad a la región reguladora de *ompSI*.

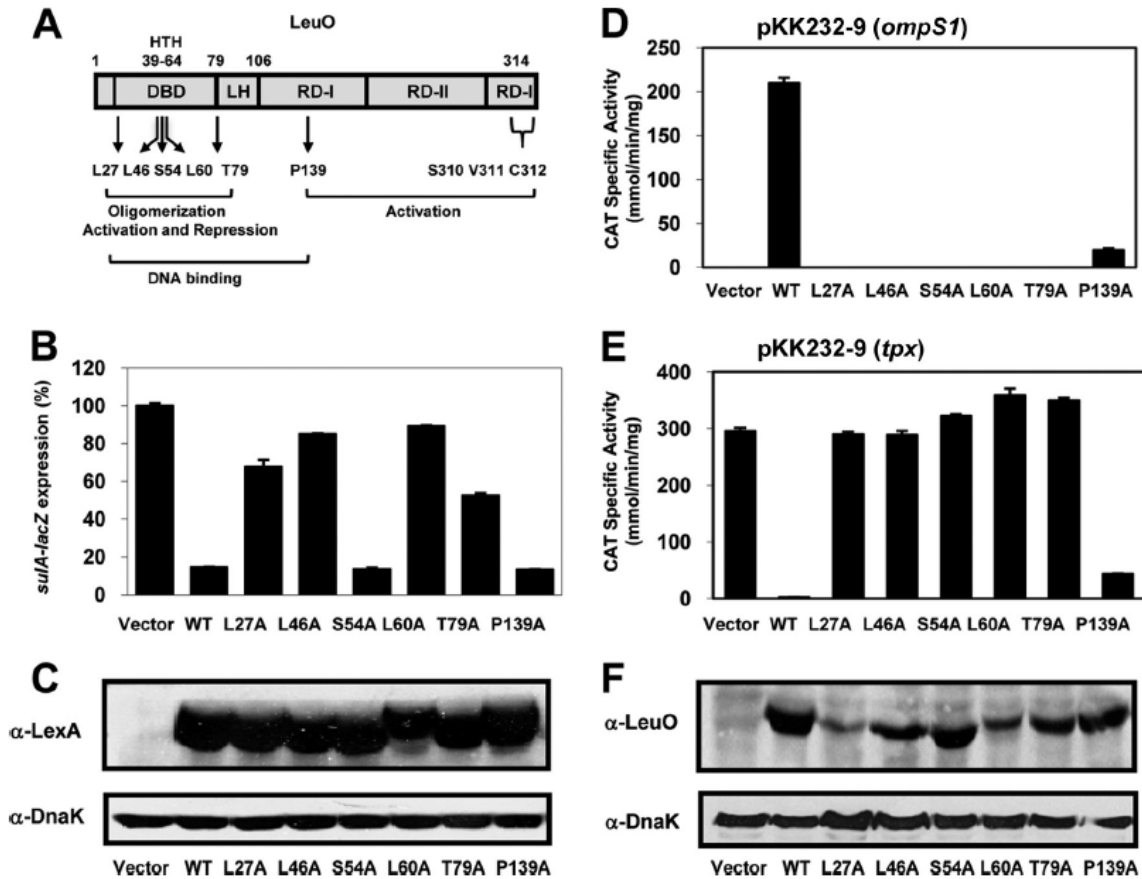


Fig. 15. Análisis de dimerización y función transcripcional de LeuO silvestre y las diferentes mutantes puntuales en el DBD y RD-I. Representación esquemática de los dominios de los LTTRs: Dominio de unión a ADN (DBD), el motivo HTH, y la hélice enlazadora (LH), Dominio Regulatorio C-terminal RD-I (central, C-terminal) y RD-II; ubicación de los seis residuos sustituidos por alanina (A). Análisis de dimerización con el sistema basado en dos híbridos de LexA, la expresión de la fusión *sulA::LacZ* en la cepa SU101 con pSR658A (vector), refleja la expresión constitutiva de la fusión, fue ajustada como el 100 %; o con pLexA-LeuOL27A, pLexA-LeuOL46A, pLexA-LeuOS54A, pLexA-LeuOL60A, pLexA-LeuOT79A y pLexA-LeuOP139A (**B**). Análisis de western blot con extractos de células con LexA-LeuO silvestre, LexA con las diferentes sustituciones por alanina en residuos en el DBD y RD-I (**C**), se utilizaron los anticuerpos anti-LexA y anti-DnaK (control de carga). Los cultivos se crecieron en LB hasta una $OD_{600} = 1.0$ y la expresión de las proteínas se indujo con IPTG (1 mM). Perfil de la expresión de *ompS1* y *tpx* fusionado al gen reportero *cat* en *S. Typhi*, con LeuO silvestre o las diferentes mutantes con sustituciones por alanina: L27A, L46A, S54A, L60A, T79A y P139A, (**D** y **E**). Expresión de LeuO Silvestre y las diferentes mutantes, se utilizó un anticuerpo policlonal anti-LeuO y anti-DnaK (control de carga), (**F**). Las cepas crecieron en medio MN a $OD_{595} = 1.0$, la expresión de las proteínas se indujo con IPTG (100 μ M).

6.8 Las mutantes en el DBD, LH y RD-I (subdominio central) de LeuO no se unen al ADN

Debido a que las mutantes en el DBD, LH y RD-I (subdominio central) mostraron defectos para formación de dímeros y en actividad transcripcional, se determinó su capacidad de unión al ADN. Se realizaron EMSAs, utilizando el fragmento de ADN (F+1) de 350-bp del gen *ompSI* de *S. Typhi*, el cual contiene la región promotora así como los sitios de unión de LeuO (De la Cruz *et al.*, 2007). Los genes que codifican para las diferentes variantes sustituidas por alanina fueron clonadas en el vector pMPMT6 Ω y se le añadió una etiqueta de seis histidinas; las proteínas se sobre-expresaron y fueron purificadas en condiciones nativas (Materiales y Métodos). En la Fig. 16, se muestran los EMSAs de cada una de las mutantes, donde se observa que no hay ninguna banda de retardamiento, por lo tanto ninguna de las mutantes mostró unión al ADN.

Sin embargo, debido a que la mutante P139A indujo de manera parcial la expresión de *ompSI*, se decidió realizar EMSAs utilizando una sonda radioactiva para obtener una mayor sensibilidad. La Fig. 17 muestra los ensayos realizados con las mutantes S54A (HTH), P139A (RD-I) y LeuO silvestre. Con este experimento se pudo observar que la mutante P139A se une al ADN aunque con baja afinidad en comparación con LeuO silvestre, la cual forma complejos DNA-proteína a concentraciones menores. Esto corrobora los resultados anteriores obtenidos con esta mutante, respecto a que induce la expresión de *ompSI*, aunque a niveles muy bajos al comparar con LeuO silvestre (Fig. 15 D). Al analizar la mutante S54A, con la cual no se observa unión al ADN, se muestra que la unión al ADN de P139A, no se debe a la sensibilidad del ensayo ya que la mutantes S54A no induce ni reprime a sus genes blancos y por lo tanto no se espera que se una al ADN. Todos estos resultados revelan que algunos residuos en el DBD de LeuO están involucrados no sólo en la unión y actividad transcripcional, sino también en la formación de dímeros, y por tanto sugerimos que también en la formación de tetrámeros, lo cual parece ser esencial para su funcionalidad.

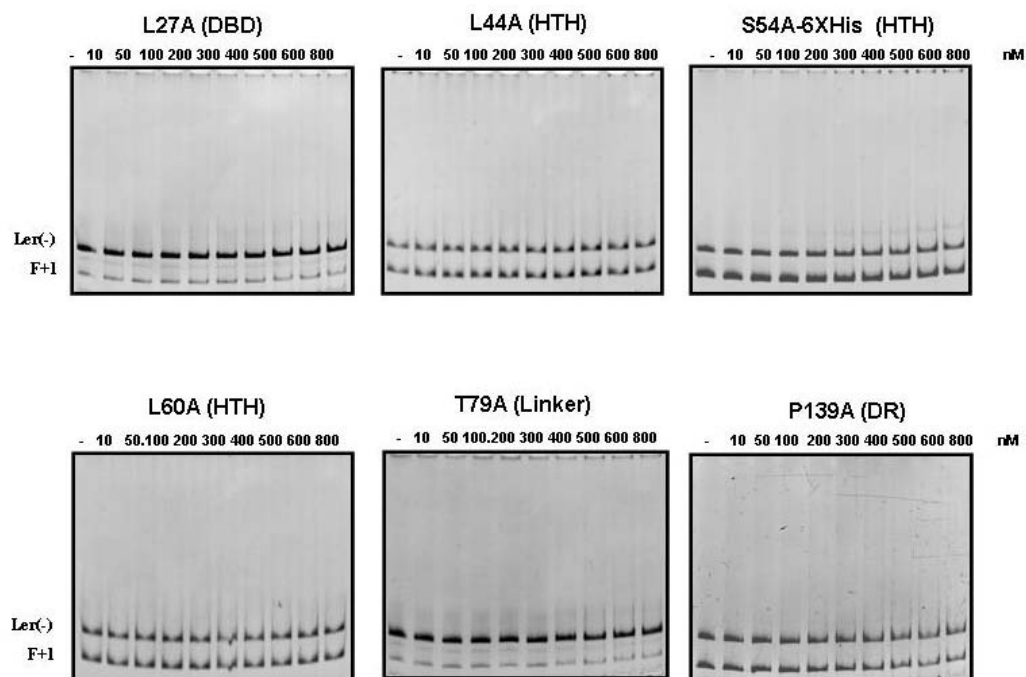


Fig. 16. Unión al ADN de las mutantes puntuales L27A, L46A, S54A L60A T79A y P139A. Ensayos de unión a ADN (EMSA) a la región reguladora del gen *ompS1*, utilizando el fragmento F+1 que contiene los sitios de unión de LeuO. Como control negativo se utilizó un fragmento con la región estructural del gen *ler*.

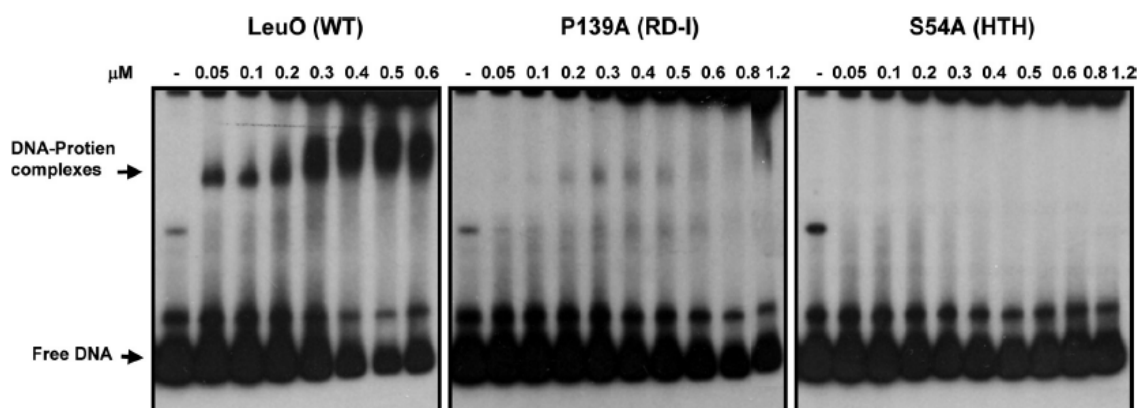


Fig. 17. Las mutantes S54A y P139 no se unen al ADN. EMSA de LeuO silvestre y las mutantes S54A, y P139A con el fragmento F+1 (región reguladora de *ompS1*), el fragmento de ADN se incubó con diferentes concentraciones de las proteínas (μM). Se observa el complejo ADN-proteína (DNA-protein complexes) y el fragmento de ADN sin proteína (Free DNA).

6.9 Las remociones en el extremo carboxilo de LeuO (subdominios RD-II y RD-I) afectan la dimerización

El extremo carboxilo de los LTTRs está involucrado en la oligomerización, principalmente en la formación de tetrámeros: sin embargo, este dominio presenta baja conservación, por lo que aún no se ha delimitado una región o aminoácidos específicos involucrados en la formación de tetrámeros (Knapp & Hu, 2009, Knapp *et al.*, 2009).

Con base en las remociones reportadas en otros LTTRs (Schell *et al.*, 1990, Maxon *et al.*, 1990, Bartowsky & Normark, 1991, Kullik *et al.*, 1995a, Muse & Bender, 1999, Lochowska *et al.*, 2001, Jourdan & Stauffer, 1998), se construyeron una serie de remociones en el extremo carboxilo de LeuO (Fig. 14 y 18 A),

Los diferentes fragmentos que codifican para los residuos 1-309, 1-304, 1-299, 1-294, 1-284 y 1-214, (Fig. 18 A), las cuales carecen de 5, 10, 15, 20, 30 y 100 aminoácidos, respectivamente, fueron clonados en el plásmido pSR658-A (Materiales y Métodos). Los resultados presentados en la Fig. 18 B muestran que todas las quimeras LexA-LeuO con remociones en el C-terminal, presentan defectos para reprimir la transcripción de la fusión *sula-lacZ*. La expresión del gen reportero fue de 50% para pLexA-LeuO1-309, 70% para pLexA-LeuO1-304, 40% para pLexA-LeuO1-299, 60% para pLexA-LeuO-1-294, 80% para pLexA-LeuO-1-284 y de 90% para pLexA-LeuO1-214 (Fig. 18 B). El ensayo de western blot, realizado con extractos celulares de las cepas utilizadas en este experimento, usando un anticuerpo anti-LexA, muestra que todas las proteína quiméricas se expresan a niveles similares a la quimera LexA-LeuO silvestre, con excepción de la quimera LexA-LeuO1-214 la cual se expresa a niveles mucho más bajos (Fig. 18 C).

Debido a que la remoción de los últimos cinco amino ácidos en el extremo carboxilo de otros LTTRs no mostró efecto alguno (Jourdan & Stauffer, 1998, Muse & Bender, 1999, Lochowska *et al.*, 2001) y que todas las proteínas truncas conservan la LH, involucrada en la formación de dímeros (Muraoka *et al.*, 2003, Sainsbury *et al.*, 2009, Monferrer *et al.*, 2010, Zhou *et al.*, 2010, Taylor *et al.*, 2012), no se esperaba que las proteínas LeuO truncas presentaran defectos para la formación de dímeros. Esto es una evidencia clara de que los subdominios RD-II y RD-I de LeuO, no sólo están involucrados en la formación de tetrámeros, sino también de dímeros.

6.10 Las variantes con remociones en el C- terminal de LeuO, abarcando los subdominios RD-II y RD-I, están afectadas en su función transcripcional

Para determinar si las remociones en el extremo carboxilo de LeuO, las cuales afectaron la formación de dímeros, tenían efecto en la función transcripcional *in vivo*, se evaluó la capacidad de estas proteínas para inducir o reprimir la expresión de sus genes blanco. Las diferentes remociones en el gen de *leuO* fueron clonados en el plásmido pFMTrc12 (Materiales y Métodos), dando origen a los siguientes plásmidos: pLeuO1-309, pLeuO1-304, pLeuO1-299, pLeuO1-294, pLeuO1-284, pLeuO1-214 (Fig. 18 A). Estos fueron introducidos en la cepa IMSS-1 conteniendo uno de los plásmidos pKK232-9 (*ompS1*) o pKK232-9 (*tpx*).

Los resultados muestran que todas estas proteínas fueron incapaces de inducir o reprimir la transcripción (Fig. 18 D y 18 E). Para corroborar que los fenotipos observados no se debieron a que las proteínas no se expresaron, se realizó un ensayo de western-blot de las cepas utilizadas en los ensayos de actividad de *cat*, utilizando un anticuerpo policlonal anti-LeuO. Las diferentes proteínas truncas se expresan en cantidades similares a la proteína LeuO silvestre, excepto proteína LeuO1-214, la cual carece de cien aminoácidos, que se expresa a niveles mucho más bajos que LeuO silvestre, sin embargo, su expresión es detectable (Fig. 18 F). Además en este ensayo se observan bandas extras lo cual se puede deber a la utilización de un anticuerpo policlonal.

Estos resultados demuestran que todas las proteínas con remociones en el C-terminal de LeuO analizadas en este trabajo, están afectadas en la dimerización y para regular la actividad transcripcional. Además, esto sugiere que a pesar de que estas proteínas tienen un DBD intacto, no se unen al ADN.

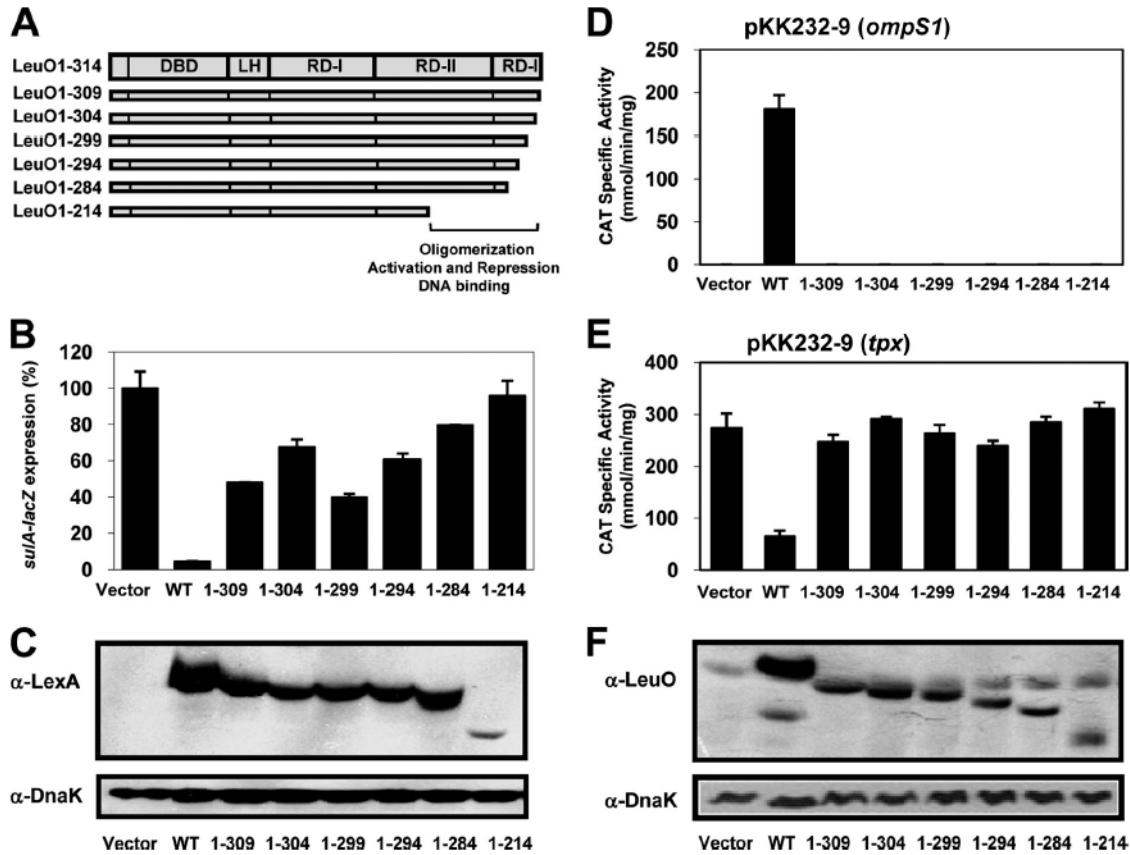


Fig. 18. Análisis de dimerización y de función reguladora de LeuO silvestre y las remociones en el extremo carboxilo. Representación esquemática de los dominios de los LTTRs: Dominio de unión a ADN (DBD), el motivo HTH, y la hélice enlazadora (LH), Dominio Regulatorio C-terminal con los subdominios RD-I (central, C-terminal) y RD-II; ubicación de las remociones en el extremo carboxilo (A). Análisis de dimerización, la expresión *sulA::lacZ* en la cepa SU101 con pSR658A (vector), se ajustó como el 100 %, de pLexA-LeuO silvestre, pLexA-LeuO1-309, pLexA-LeuO1-304, pLexA-LeuO1-299, pLexA-LeuO1-294, pLexA-LeuO1-284, pLexA-LeuO1-214 (B). La expresión de LexA-LeuO silvestre y las diferentes remociones fusionadas a LexA se valuó por western-blot con un anticuerpo policlonal anti-LexA y un anticuerpo anti-DnaK, como control de carga, (C). Las cepas se crecieron en LB hasta $OD_{600} = 1.0$, la expresión de las proteínas se indujo con IPTG (1.0 mM). Perfil transcripcional de las fusiones de los genes *ompS1* y *tpx* de *S. Typhi* al gen reportero *cat*, con LeuO silvestre y las diferentes proteínas truncas en el extremo carboxilo: LeuO1-309, LeuO1-304, -LeuO1-299, LeuO-1-294, LeuO1-284, LeuO1-214 (D y E). El análisis de la expresión de LeuO silvestre y proteínas truncas se evaluó por western-blot con un anticuerpo policlonal anti-LeuO y un anticuerpo anti-DnaK (control de carga) (F). Las cepas se crecieron en medio MN hasta $OD_{595} = 1.0$ y la expresión de las proteínas se indujo con IPTG (100 μ M).

6.11 Las variantes con remociones en el extremo carboxilo de LeuO no se unen al ADN

Evaluamos la capacidad de unión al ADN de las proteínas LeuO1-309 y LeuO1-284, afectadas en dimerización y función transcripcional. Los fragmentos de ADN que codifican para las proteínas con remociones en el C-terminal, más una etiqueta de seis histidinas, fueron clonados en el plásmido pMPMT6Ω, las proteínas fueron sobre expresadas y purificadas en condiciones nativas (Materiales y Métodos). Estas proteínas truncas se analizaron por EMSAs utilizando el fragmento (F+1), región reguladora de *ompS1*; al compararlas con LeuO silvestre, no mostraron la formación de banda alguna de retardamiento en la migración electroforética, ni a concentraciones más altas de proteína (Fig. 19), por lo tanto esto sugiere que estas mutantes no se unen al ADN.

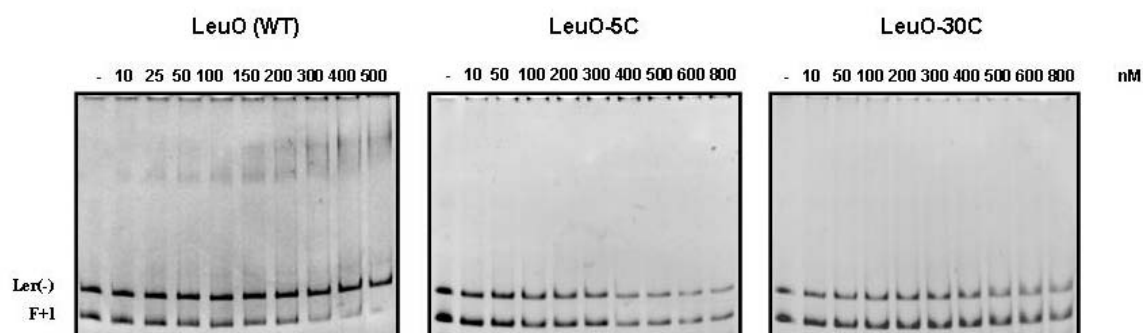


Fig. 19. Unión a DNA de las mutantes puntuales S54A y P139A. Ensayos de unión a DNA (EMSA) a la región reguladora del gen *ompS1*, utilizando los fragmentos F+1 que contiene los sitios de unión de LeuO. A) LeuO silvestre, B) la mutante S54A, localizada en el HTH y C) la mutante P139A localizada en la parte central de LeuO. Como control negativo se utilizó un fragmento con la región estructural de Ler.

6.12 Las mutantes en los últimos cinco residuos de aminoácidos de LeuO dimerizan pero están afectadas diferencialmente en su función transcripcional

Debido a que la quimera LexA-LeuO1-309 mostró defectos en dimerización (Fig. 18 B), se analizó el efecto de sustituciones por alanina de cada uno de los cinco últimos residuos en la dimerización, utilizando el sistema de interacción proteína-proteína basado en LexA. Los resultados muestran que todas las mutantes fusionadas a LexA fueron capaces de reprimir la expresión del reportero *sulA-lacZ*, tan eficientemente como LexA-LeuO silvestre; por lo tanto estas mutantes conservan la capacidad de dimerizar (Fig. 20 A). Para verificar la expresión de las proteínas fusionadas a LexA se realizó un western blot con extractos de células con las fusiones LexA-LeuO silvestre, LexA-S310A, LexA-V311A, LexA-C312A, LexA-K313A y LexA-R314A. Como se observa en la Fig. 20 B, todas las quimeras se expresaron a niveles similares que LexA-LeuO silvestre.

Para analizar la capacidad de estas mutantes para inducir o reprimir la transcripción, las cinco variantes fueron clonadas en el vector pFMTrc12 (Materiales y Métodos), dando como resultado a los plásmidos pLeuOS310A, pLeuOV311A, pLeuOC312A, pLeuOK313A y pLeuOR314A, que se utilizaron para transformar la cepa IMSS-1 conteniendo los plásmidos pKK232-9 (*ompS1*) o pKK232-9 (*tpx*). Los resultados mostraron que sólo las mutantes K313A y R314A fueron capaces de inducir la expresión de la fusión *ompS1-cat* a niveles similares que LeuO silvestre; a diferencia de las mutantes S310A, V311A y C312A (Fig. 21 A). Sin embargo, las cinco mutantes fueron capaces de reprimir la expresión de la fusión *tpx-cat* (Fig. 21 B). Para verificar la expresión de estas mutantes, realizamos ensayos de western blot, el cual mostró que todas las quimeras se expresan a niveles muy similares que LexA-LeuO silvestre (Fig. 21 C).

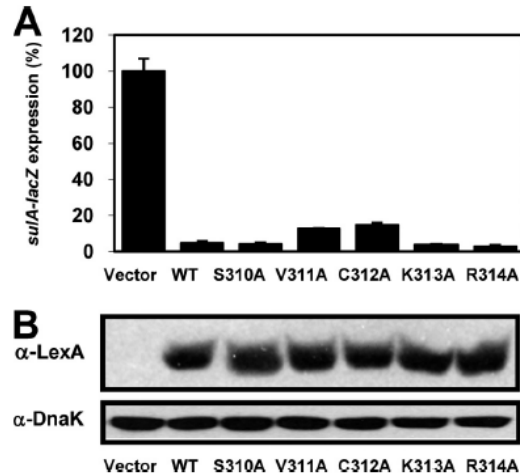


Fig. 20. Análisis de dimerización de las mutantes con sustituciones por alanina en cada uno de los últimos cinco residuos de LeuO (subdominio RD-I-terminal). Niveles de expresión de *sulA::LacZ* en la cepa SU101 con pSR658A (vector) y de las diferentes fusiones: pLexA-LeuO silvestre, pLexA-LeuOS310A, pLexA-LeuOV311A, pLexA-LeuOC312A, pLexA-LeuOK313A, pLexA-LeuOR314A (A). Análisis de western blot de extractos celulares con LexA-LeuO silvestre y las diferentes mutantes puntuales (B), con un anticuerpo anti-LexA anticuerpo (panel superior) y un anticuerpo anti-DnaK como control de carga (panel inferior).

Estos resultados demuestran que la sustitución por alanina de cada uno de los últimos cinco residuos de LeuO, no afecta la dimerización (Fig. 20 A y B). Sin embargo, estas mutantes mostraron diferencia en la función transcripcional, debido a que las mutantes K313A y R314A (Fig. 14) conservan la capacidad de inducir y reprimir la expresión genética. Esto contrasta con las mutantes S310A, V311A y C312A, cuyos residuos forman parte de la última hélice predicha para LeuO (Fig. 14), las cuales que reprimieron la expresión de *tpx* pero perdieron la capacidad para inducir la expresión de *ompSI* (Fig. 21 A y B): este fenotipo fue el mismo observado para la mutante P139A (Fig. 15 D y E), la cual está localizada en subdominio RD-I central (Fig. 14). Esto, sugiere que los residuos de LeuO localizados en el subdominio RD-I, tanto en la parte central como terminal, solo están involucrados en el mecanismo de inducción de la transcripción.

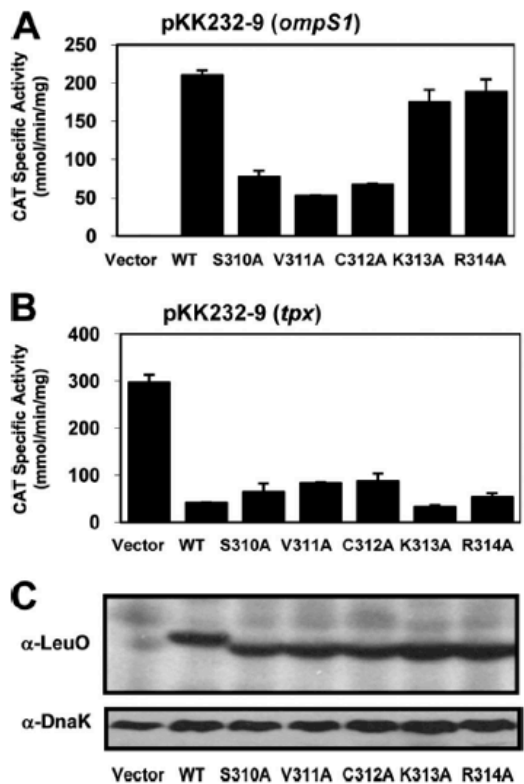


Fig. 21. Análisis de la función reguladora de las mutantes puntuales en cada uno de los últimos cinco residuos de LeuO (subdominio RD-I- terminal). Perfil transcripcional de los genes *ompS1* y *tpx* de *S. Typhi* en presencia de LeuO silvestre y con las diferentes mutantes, LeuOS310A, LeuOV311A, LeuOC312A, LeuOK313A y LeuOR314A (A y B). La expresión de LeuO silvestre y las diferentes proteínas mutantes se evaluó por western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-LeuO y un anticuerpo monoclonal anti-DnaK (control) (C). Las cepas se crecieron en medio MN hasta alcanzar una $DO_{595} = 1.0$, la expresión de las proteínas se indujo con IPTG (100 μ M).

7. DISCUSIÓN

En este trabajo, nos planteamos el objetivo de iniciar la caracterización de LeuO de *Salmonella enterica* serovar Typhi cepa IMSS-1. Para dar cumplimiento a nuestro objetivo, en un principio se determinó el estado oligomérico de LeuO, se purificó en las dos condiciones reportadas, donde se ha obtenido la proteína y se ha utilizado para ensayos de unión al ADN (Fernandez-Mora *et al.*, 2004, De la Cruz *et al.*, 2007). De esta manera, purificamos LeuO en condiciones nativas (LeuO-6xHis-NC) y en condiciones desnaturalizantes (LeuO-6xHis-DC). Al analizar la unión al ADN por medio de EMSAs, observamos con LeuO-6xHis-NC un complejo de interacción o de, mientras que, con la preparación LeuO-6xHis-DC, no observamos ninguna banda con movilidad retardada (Fig. 10). Este resultado fue inesperado, debido a que se ha observado que LeuO purificada en condiciones desnaturalizantes se une al mismo fragmento de ADN (región reguladora de *ompS1*). Sin embargo, el que no se haya observado unión al ADN, puede deberse a que fueron preparaciones diferentes y las proteínas obtenidas pueden haber experimentado cambios, lo cual se explorará más adelante. Estos cambios no se debieron a que LeuO haya sido clonada de manera diferente ya que en ambos vectores se utilizó la etiqueta Hisx6 en el extremo carboxilo de LeuO (Materiales y Métodos). A este respecto, la etiqueta Hisx6 no parece afectar la función de LeuO ya que se observa el mismo efecto en la regulación de sus genes blanco con y sin etiqueta (Fernandez-Mora *et al.*, 2004). De esta manera, la mayoría de los LTTRs estudiados han sido purificados y utilizados con la etiqueta Hisx6 para los estudios de función y estructura, sin que en aquellos donde se hicieron las comparaciones haya afectado los resultados con respecto a las proteínas sin etiqueta (Jourdan & Stauffer, 1998, Lochowska *et al.*, 2004, Rosario & Bender, 2005, Ezezika *et al.*, 2007, Sainsbury *et al.*, 2009, Zhou *et al.*, 2010, Ruangprasert *et al.*, 2010, Monferrer *et al.*, 2010, Sainsbury *et al.*, 2012).

Con base a lo anterior para determinar el estado oligomérico LeuO, está fue purificada bajo condiciones nativas por cromatografía de exclusión molecular. Mediante la purificación en condiciones nativas se obtuvo LeuO en cantidades y pureza adecuadas para este ensayo esto permitió determinar de manera muy clara que LeuO forma tetrámeros en solución (Fig. 11).

Para tener algún indicio que nos permitiera entender las diferencias entre las dos preparaciones de LeuO, analizamos las mismas en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE-NC). Observamos que LeuO-6XHis-NC muestra solo una banda (Fig. 12 A), lo que concuerda con los resultados obtenidos por cromatografía de exclusión molecular, donde solo obtuvimos una señal correspondiente al tetrámero. Sin embargo, en la preparación LeuO-6XHis-DC se observan muchas bandas que al parecer son diferentes formas oligoméricas (Fig. 12 A), las cuales parecen corresponder a monómero, dímero e incluso observamos una banda que pudiera corresponder al tetrámero (Fig. 13). Esto último se observa con mayor claridad en la Fig. 13 A, y al parecer, el tetrámero es la forma oligomérica menos abundante en esta preparación. Las diferentes formas oligoméricas en LeuO-6XHis-DC (monómero, dímero y tetrámero), (Fig. 13 B y C), se sugieren con base en la comparación de la migración electroforética de LeuO con respecto a Ler, una proteína que ha sido caracterizada y se ha determinado las diferentes formas oligoméricas, tanto de Ler silvestre como mutantes (Medrano-López *et al.*, en preparación).

En un intento para determinar si LeuO-6XHis-DC no se une al ADN, realizamos EMSAs de mayor sensibilidad con la finalidad de comparar la unión al ADN con LeuO-6xHis-NC. Observamos que LeuO-6xHis-NC se une al ADN, como previamente se había demostrado (Fig. 10), desde concentraciones muy bajas (Fig. 12 D). De manera interesante, observamos que LeuO-6XHis-DC se une al ADN, sin embargo, se requiere de concentraciones diez veces mayor de proteína para poder observar el retardo en la movilidad del mismo fragmento de ADN (Fig. 12 E). Esto sugiere, que ya sea una o todas las formas oligoméricas (Monómero>Dímero>Trímero>Tetrámero) se unen al ADN aunque al parecer con mucho menor afinidad. También, puede ser que solo el tetrámero presente en LeuO-6XHis-DC (Fig. 13 A), es la forma oligomérica que se une al ADN y por lo tanto al ser la forma menos abundante se requiere de mayor concentración de la preparación para que se una al ADN y el complejo se pueda observar. Sin embargo, es importante resaltar que en ambos EMSAs se aprecia la formación de complejos similares a los formados con LeuO-6XHis-NC, donde existe el tetrámero (Fig. 13 D) y no se observa con claridad la formación de otros complejos que pudieran sugerir la unión de las diferentes formas oligoméricas con el ADN (Fig. 12 D y E).

A este respecto, en algunos LTTRs se han encontrado diferentes formas oligoméricas; como DntR que forma tetrámeros en solución, pero se encontraron homodímeros en cristales (Smirnova *et al.*, 2004). El caso de ArgP, éste forma dímeros en los cristales y en solución; sin embargo se ha propuesto que su forma activa es como tetrámero, mediante la unión cooperativa de un dímero de dímeros, a dos sitios durante el contacto con el ADN, facilitando así el reclutamiento de la ARN polimerasa (Zhou *et al.*, 2010, Lee *et al.*, 1997). Otros LTTRs, como MetR, NodD3 y Nac, forman dímeros completamente funcionales que activan o reprimen la transcripción e interaccionan con el ADN *in vitro* (Maxon *et al.*, 1990, Fisher & Long, 1993, Muse & Bender, 1999). Sin embargo, en trabajos posteriores se encontró que Nac y MetR, pueden formar tetrámeros los cuales también pueden ser funcionales e incluso en el caso de Nac esto diferencia entre la formación de dímero o tetrámero determina su mecanismo de activación o represión (Rosario & Bender, 2005, Sainsbury *et al.*, 2012). De acuerdo con lo anterior, existe la posibilidad de que LeuO a través de la interacción de un dímero de dímeros se una al ADN. Sin embargo, de acuerdo a los datos presentados en este trabajo parece ser que el tetrámero de LeuO es la forma oligomérica que se une al ADN *in vitro* de manera más eficiente (Fig. 12 D). Por lo tanto, LeuO forma parte de la subclase de LTTRs que incluye a NahR, TrpI, CysB, BenM, CbnR, DntR, TsaR, AphB y ArgP, para los cuales el homotetrámero es la forma oligomérica biológicamente funcional (Schell *et al.*, 1990, Hryniewicz & Kredich, 1994, Muraoka *et al.*, 2003, Monferrer *et al.*, 2010, Taylor *et al.*, 2012, Sainsbury *et al.*, 2009, Smirnova *et al.*, 2004, Bundy *et al.*, 2002, Zhou *et al.*, 2010, Ruangprasert *et al.*, 2010).

Con la finalidad de caracterizar la funcionalidad de los dominios descritos para varios LTTRs, analizamos el efecto de diferentes mutantes de LeuO, en su capacidad de oligomerización, actividad transcripcional y la unión al ADN *in vitro*. Primero analizamos el DBD y en el subdominio RD-I central, mediante sustituciones por alanina, en seis residuos conservados (Fig. 14), obteniendo las mutantes L27A, localizada en la región extendida del extremo amino, L46A y L60A, localizadas en el motive HTH y T79A, cercana al LH (Fig. 15 A). Al analizar estas mutantes, mediante el sistema de LexA, encontramos defectos en su capacidad de dimerización (Fig. 15 B). Además fueron incapaces de inducir y reprimir la expresión de *ompS1* y *tpx*, respectivamente (Fig. 15 D y

E), así como de interactuar con el ADN *in vitro* (Fig. 16). Las fallas en su función transcripcional y de unión al ADN eran de esperarse debido a su localización, sin embargo, su defecto para la formación de dímeros, fue de alguna manera inesperado. Sin embargo, es importante mencionar que, en trabajos previos utilizando mutaciones que se localizan dentro del DBD y LH de ArgP, K42E, R60E y L71W; no se observa la formación de dímeros ya que están disociadas en monómeros. Así mismo, para ArgP también se ha demostrado la interacción del C-terminal y el DBD de cada monómero y entre dímeros lo cual sugiere que cambios en el DBD o carboxilo terminal afectan la interacción entre los monómeros y dímeros (Zhou *et al.*, 2010).

Por otro lado, la mutante S54A, localizada en el HTH, y P139A, en la región correspondiente a subdominio RD-I central, mostraron la capacidad de dimerizar como LeuO silvestre (Fig. 15 B). No obstante, la mutante S54A está afectada totalmente en su actividad transcripcional y en la unión al ADN *in vitro* (Fig. 15D, E y Fig. 17). De acuerdo con estos resultados, en los LTTRs el residuo Ser54 localizado en el motivo HTH, es uno de los residuos más conservados en la hélice de reconocimiento del ADN (Fig. 14), y se ha propuesto que este residuo interactúa con el surco mayor del ADN (Sainsbury *et al.*, 2009). Además, el residuo Ser54 corresponde a la Ser35 en AmpR, Ser33 en OxyR, Ser38 en CysB y en GcvA, donde se ha demostrado que estos residuos son importantes para la interacción con el ADN, pero no tienen ninguna función en la oligomerización (Schell, 1993, Kullik *et al.*, 1995a, Jourdan & Stauffer, 1998, Lochowska *et al.*, 2001).

La mutante P139A mostró fallas para inducir la expresión de *ompS1*, alrededor del 10 % con respecto a LeuO silvestre (Fig. 15 D), además se une con menor afinidad a su región reguladora de *ompS1* (Fig. 17). Sin embargo, conservo la capacidad de reprimir casi en su totalidad la expresión de *tpx* (Fig. 15 E). En este trabajo no se analizó la unión de LeuO silvestre ni mutantes a la región reguladora de *tpx*, sin embargo, con base a los datos presentados en este trabajo resulta interesante explorar la unión de LeuO y las mutantes a los genes donde LeuO es represor transcripcional. El fenotipo de la mutante P139A, resulta interesante, debido a que está localizado en el subdominio RD-I central (Fig. 14 y 15 A), involucrado en los LTTRs con la unión y respuesta al inductor (Schell, 1993, Maddocks & Oyston, 2008).

Debido a que hasta el momento no se sabe si LeuO responde o no a un inductor, en este trabajo no abordamos la función del subdominio RD-I central en la unión y respuesta al inductor. Los datos anteriores en conjunto indican que algunos residuos localizados en el DBD de LeuO podrían estar involucrados en la formación de dímeros y estas sustituciones afectan la unión al ADN y su actividad transcripcional. También, el fenotipo observado puede deberse a que estas mutaciones localizadas en el DBD LeuO afectan el plegamiento correcto de la proteína o participan en la formación y estabilidad del dímero. Sin embargo, mutantes en otros residuos localizados en esta región no están involucrados en la formación de dímero, pero son importantes para la interacción con el ADN y para la actividad transcripcional.

En el extremo carboxilo de los LTTRs se encuentra el dominio regulatorio (RD) el cual abarca la mayor parte de la proteína: éste a su vez se divide en dos subdominios RDI y RDII (Fig. 1). Se ha determinado que el dominio RD está involucrado en la oligomerización, principalmente en la formación de tetrámeros, sin que hasta el momento se haya podido delimitar una región o residuos específicos para esta función debido a la baja conservación en la secuencia (Fig. 14). Para analizar el dominio RD de LeuO, diseñamos y construimos varias remociones en el extremo carboxilo, desde cinco hasta cien residuos de aminoácidos (Fig. 18 A). En el ensayo de dimerización, mediante el sistema de LexA, observamos que todas las proteínas con remociones en el C-terminal de LeuO mostraron defectos en la dimerización (Fig. 18 B), en la función transcripcional (Fig. 18 D y E) y en la unión al ADN *in vitro* (Fig. 19), incluso la proteína a la que solo se le removió cinco residuos. Esto resultó interesante debido a que cuando se removieron cinco, once y catorce aminoácidos en el extremo carboxilo de CysB, OxyR y GcvA, respectivamente, la función de éstas fue similar a la proteína silvestre o se volvieron activas constitutivas, por lo tanto conservaron la capacidad de unirse al ADN (Kullik *et al.*, 1995a, Lochowska *et al.*, 2001, Jourdan & Stauffer, 1998).

Sin embargo, también existen caso como en NahR cuando se removieron 9 residuos del C-terminal, se observó un defecto drástico en la actividad transcripcional y la unión al ADN.

La remoción de 16 o 22 residuos en CysB y OxyR, respectivamente, afectó su capacidad de reprimir pero fueron activas constitutivas, éstas proteínas fueron capaces de formar dímeros pero no tetrámeros, lo cual sugiere que esta región está involucrada en la formación de tetrámeros, que sería la forma oligomérica involucrada en el mecanismo de que represión de la transcripción. También cuando se analizaron las mutantes A233V de OxyR y A227D de CysB, se observó que conservaron la capacidad de reprimir y activaron la transcripción constitutivamente, también fueron capaces de formar dímeros, pero no tetrámeros y mantuvieron la capacidad de unirse al ADN (Schell *et al.*, 1990, Bartowsky & Normark, 1991, Kullik *et al.*, 1995a, Lochowska *et al.*, 2001, Jourdan & Stauffer, 1998). Lo anterior, sugiere que varios LTTR, incluyendo a LeuO, funcionan como tetrámeros y que el extremo carboxilo (subdominios RD-I y RD-II) es muy importante para la adecuada formación de su oligómero lo cual es importante para su completa funcionalidad.

En un intento por entender lo observado con las proteínas con remociones en el C-terminal, realizamos el análisis de sustituciones por alanina de los últimos cinco residuos del extremo carboxilo de LeuO. De manera interesante éstas mutantes no mostraron defectos en la dimerización (Fig. 20 A), además de que conservaron la capacidad de reprimir la expresión de *tpx* (Fig. 21 B), lo cual sugiere que las cinco mutantes pueden unirse al ADN. Sin embargo, las mutantes S310A, V311A y C312A mostraron defectos en su capacidad de inducir la expresión de *ompSI* (Fig. 21 A). Este mismo fenotipo fue el observado con la mutante P139A que induce en bajos niveles la expresión y se une con baja afinidad a la región reguladora de *ompSI* (Fig. 17). Estos tres residuos forman parte de la última hélice predicha de LeuO (Fig. 14) y junto con el residuo P139, están localizados en el subdominio RD-I (tanto de la parte central como terminal de la proteína), y parecen tener implicaciones en el correcto funcionamiento de LeuO para inducir la expresión de *ompSI*.

Respecto a las diferencias en los mecanismos LTTRs para activar y reprimir la expresión de genes se ha reportado que Nac, dependiendo del tipo de oligómeros que forme, presenta diferencias para activar o reprimir. Requiere de la formación de tetrámeros para reprimir su propia expresión. Sin embargo, como dímero es capaz de activar eficientemente la transcripción y de unirse a la región reguladora de varios de sus genes blanco. Más aún, como dímero reprime parcialmente a *gdhA*, uniéndose a un solo sitio en

su región reguladora, pero requiere del tetrámero para reprimir completamente su expresión uniéndose a dos sitios en el ADN (Rosario & Bender, 2005).

De acuerdo a lo anterior, las mutantes P139A, S310A, V311A y C312A indujeron parcialmente la expresión de *ompS1* (Fig. 21) y no mostraron defectos para formar dímeros (Fig. 20). Puede ser que estas mutantes conserven la capacidad de formar tetrámeros, o incluso si sólo forman dímeros, al parecer tienen defectos en la interacción con la región reguladora de *ompS1*. Incluso éstas mutantes podrían estar afectadas en su capacidad para desplazar eficientemente a H-NS, y de esta manera ejercen una desrepresión parcial (Fig. 22). Respecto al mecanismo de represión, estas mutantes al parecer son capaces de interaccionar con la región reguladora de *tpx* y reprimir eficiente su expresión ya sea como dímeros o tetrámeros (Fig. 22)

A este respecto, en el presente trabajo el tetrámero de LeuO se unió con mayor eficiencia al ADN *in vitro*; así mismo fue la forma oligomérica que se obtuvo al purificar la proteína en condiciones nativas (Fig. 11 y Fig. 12 D). La coexistencia de dímeros y tetrámeros, como los descritos para Nac, no se encontró en la preparación de LeuO-6XHis-NC. Sin embargo, no podemos descartar que algunas de las mutantes descritas en este trabajo sean capaces de formar dímeros *in vivo*, las cuales mantengan la capacidad de reprimir la expresión de *tpx*. La manera en que estas mutantes serían capaces de reprimir la expresión de *tpx*, pero no de inducir la expresión de *ompS1*, es una pregunta que queda abierta y podría ser de interés para estudios futuros. Lo anterior resulta más interesante debido a que para los LTTRs los mecanismos de auto-represión así como de represión de genes que no se encuentran divergentes al gen del regulador LTTR han sido poco estudiados, siendo el mecanismo de activación el que se ha estudiado con más detalle (Tropel & van der Meer, 2004, Maddocks & Oyston, 2008).

En este trabajo pudimos determinar, mediante el uso de diferentes técnicas, que LeuO presenta algunas de las características que definen a esta familia, tales como: i) la organización de promotores divergentes; ii) actividad dual en donde induce y reprime diferentes genes; iii) la funcionalidad de su DBD; y iv) el extremo carboxilo está involucrado en la oligomerización incluyendo los últimos cinco residuos. Describimos la importancia de cada dominio de LeuO en el proceso de oligomerización, transcripción, así como la interacción con el ADN.

Nuestros datos sugieren la posible interacción del extremo carboxilo con el DBD, lo cual puede ser muy importante para la formación y estabilidad del dímero y por lo tanto para el tetrámero, los resultados pueden ser consultados (Guadarrama *et al.*, 2014a)

Con lo descrito en este trabajo, demostramos por primera vez aspectos interesantes de la relación estructura-función de LeuO, por lo que el estudio a futuro en este campo ayudará a entender mejor sus diversas funciones.

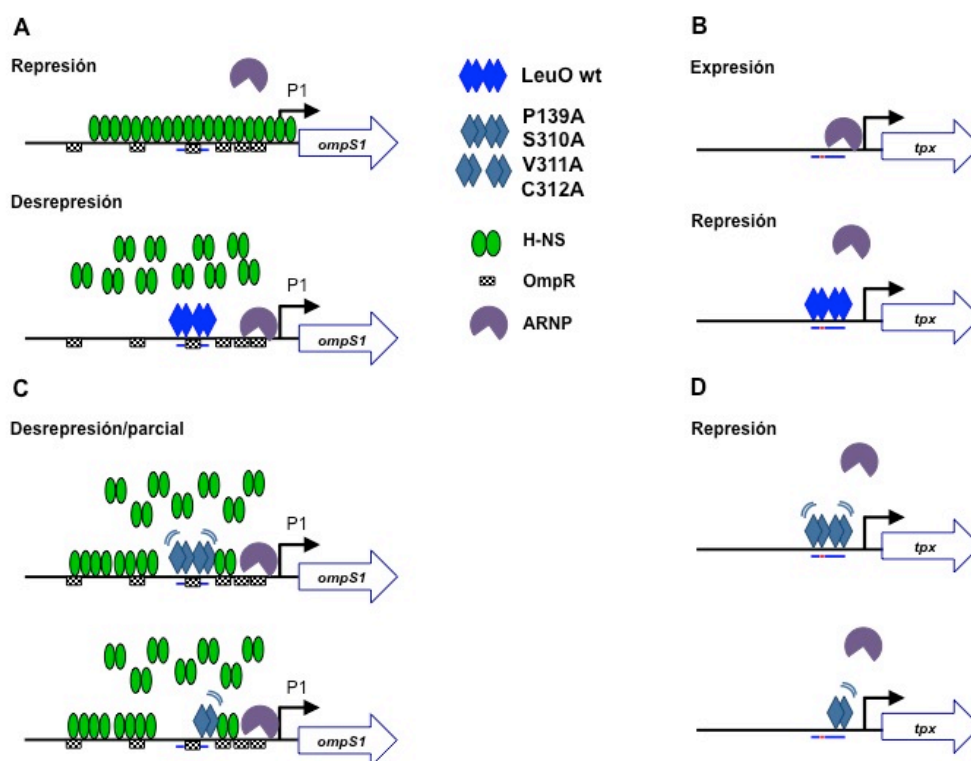


Fig. 22. Representación esquemática de la actividad transcripcional de LeuO silvestre y mutantes en el RD-I sobre *ompS1* (desrepresión) y *tpx* (represión). (A), modelo de desrepresión de *ompS1*; sitios de nucleación de H-NS en las cajas de unión I y IV de OmpR, su polimerización impide el acceso de la ARN polimerasa (ARNP); unión de LeuO al sitio I, desplazando a H-NS. (B), sitios de unión de LeuO sobre la región reguladora de *tpx*, causando represión. Posible interacción de las mutantes P139A, S310A, V311A y C312A, ya sea como dímeros o tetrámeros, que provoca la desrepresión parcial de *ompS1*, (C) y a la región reguladora de *tpx*, donde son capaces de reprimir tan eficientemente como LeuO silvestre, (D).

8. CONCLUSIONES

- LeuO forma tetrámeros en solución: proponemos que ésta es la forma oligomérica que se une con mayor afinidad al ADN.
- Las remociones en el dominio carboxilo y las mutantes puntuales en el DBD y LH de LeuO, afectaron la capacidad de formación de dímeros, la función reguladora y la unión al ADN.
- Las mutantes en el HTH y RD-I (subdominio central) forman dímeros; sin embargo, están afectadas en su función reguladora y en la unión al ADN (baja afinidad).
- No sólo el dominio carboxilo está involucrado en la oligomerización: el DBD y las regiones centrales de LeuO también tienen efecto en la oligomerización, y esto afecta la función reguladora y la unión al ADN *in vitro*.
- Las mutantes puntuales en los últimos residuos de LeuO en RD-I (subdominio terminal) no afectaron la dimerización, pero sí afectaron diferencialmente la función transcripcional.
- Mutantes como la P139A, afectada principalmente en inducir (desreprimir) pero no para reprimir la transcripción, pudieran ser útiles para estudiar las diferencias entre estos dos mecanismos de regulación de LeuO y que pudieran estar relacionados con la oligomerización.

9. PERSPECTIVAS

- Purificar a gran escala las proteínas mutantes S54A y P139A además de la mutantes S310A, V311A, C312A, K313A, y R314A para:
 - a) Determinar la oligomerización por cromatografía de exclusión molecular y geles nativos.
 - b) Ensayos de unión al DNA (*ompS1*, *tpx*, *ompX*).
- Determinar si el tetrámero o el dímero son la forma oligomérica requerida para el mecanismo de represión ejercido por LeuO.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmer, B.M., J.N. Smith, J.L. Dyszel & A. Lindsay, (2007) Methods in cell-to-cell signaling in *Salmonella*. *Methods in molecular biology* **394**: 307-322.
- Ante, V.M., X.R. Bina & J.E. Bina, (2015a) The LysR-type regulator LeuO regulates the acid tolerance response in *Vibrio cholerae*. *Microbiology* **161**: 2434-2443.
- Ante, V.M., X.R. Bina, M.F. Howard, S. Sayeed, D.L. Taylor & J.E. Bina, (2015b) *Vibrio cholerae leuO* Transcription Is Positively Regulated by ToxR and Contributes to Bile Resistance. *Journal of bacteriology* **197**: 3499-3510.
- Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D.A. Romero & P. Horvath, (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**: 1709-1712.
- Bartowsky, E. & S. Normark, (1991) Purification and mutant analysis of *Citrobacter freundii* AmpR, the regulator for chromosomal AmpC β -lactamase. *Molecular microbiology* **5**: 1715-1725.
- Bender, R.A., (1991) The role of the NAC protein in the nitrogen regulation of *Klebsiella aerogenes*. *Molecular microbiology* **5**: 2575-2580.
- Bertin, P., P. Lejeune, C. Laurent-Winter & A. Danchin, (1990) Mutations in *bglY*, the structural gene for the DNA-binding protein H1, affect expression of several *Escherichia coli* genes. *Biochimie* **72**: 889-891.
- Bina, X.R., D.L. Taylor, A. Vikram, V.M. Ante & J.E. Bina, (2013) *Vibrio cholerae* ToxR downregulates virulence factor production in response to cyclo(Phe-Pro). *mBio* **4**: e00366-00313.
- Brenner, F.W., R.G. Villar, F.J. Angulo, R. Tauxe & B. Swaminathan, (2000) *Salmonella* nomenclature. *Journal of clinical microbiology* **38**: 2465-2467.
- Bundy, B.M., L.S. Collier, T.R. Hoover & E.L. Neidle, (2002) Synergistic transcriptional activation by one regulatory protein in response to two metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 7693-7698.
- Bustamante, V.H., M.I. Villalba, V.A. Garcia-Angulo, A. Vazquez, L.C. Martinez, R. Jimenez & J.L. Puente, (2011) PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **82**: 398-415.
- Calva, E., J.L. Puente & J.J. Calva, (1988) Research opportunities in typhoid fever: epidemiology and molecular biology. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **9**: 173-177.
- Chen, C.C., M.Y. Chou, C.H. Huang, A. Majumder & H.Y. Wu, (2005) A cis-spreading nucleoprotein filament is responsible for the gene silencing activity found in the promoter relay mechanism. *The Journal of biological chemistry* **280**: 5101-5112.
- Chen, C.C., M. Fang, A. Majumder & H.Y. Wu, (2001) A 72-base pair AT-rich DNA sequence element functions as a bacterial gene silencer. *The Journal of biological chemistry* **276**: 9478-9485.
- Chen, C.C., M. Ghole, A. Majumder, Z. Wang, S. Chandana & H.Y. Wu, (2003) LeuO-mediated transcriptional derepression. *The Journal of biological chemistry* **278**: 38094-38103.

- Chen, C.C. & H.Y. Wu, (2005) LeuO protein delimits the transcriptionally active and repressive domains on the bacterial chromosome. *The Journal of biological chemistry* **280**: 15111-15121.
- Chen, H.M., Y. Wang, L.H. Su & C.H. Chiu, (2013) Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatrics and neonatology* **54**: 147-152.
- Choi, H., S. Kim, P. Mukhopadhyay, S. Cho, J. Woo, G. Storz & S.E. Ryu, (2001) Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell* **105**: 103-113.
- Clamp, M., J. Cuff, S.M. Searle & G.J. Barton, (2004) The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* **20**: 426-427.
- Clark, T., S. Haddad, E. Neidle & C. Momany, (2004) Crystallization of the effector-binding domains of BenM and CatM, LysR-type transcriptional regulators from *Acinetobacter* sp. ADP1. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **60**: 105-108.
- Coburn, B., G.A. Grassl & B.B. Finlay, (2007) *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and cell biology* **85**: 112-118.
- Cotter, P.A. & V.J. DiRita, (2000) Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annual review of microbiology* **54**: 519-565.
- Craven, S.H., O.C. Ezezika, S. Haddad, R.A. Hall, C. Momany & E.L. Neidle, (2009) Inducer responses of BenM, a LysR-type transcriptional regulator from *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Molecular microbiology* **72**: 881-894.
- Daines, D.A. & R.P. Silver, (2000) Evidence for multimerization of neu proteins involved in polysialic acid synthesis in *Escherichia coli* K1 using improved LexA-based vectors. *Journal of bacteriology* **182**: 5267-5270.
- De la Cruz, M.A., M. Fernandez-Mora, C. Guadarrama, M.A. Flores-Valdez, V.H. Bustamante, A. Vazquez & E. Calva, (2007) LeuO antagonizes H-NS and StpA-dependent repression in *Salmonella enterica* *ompS1*. *Molecular microbiology* **66**: 727-743.
- Dillon, S.C., E. Espinosa, K. Hokamp, D.W. Ussery, J. Casadesus & C.J. Dorman, (2012) LeuO is a global regulator of gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular microbiology*.
- Dmitrova, M., G. Younes-Cauet, P. Oertel-Buchheit, D. Porte, M. Schnarr & M. Granger-Schnarr, (1998) A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Molecular & general genetics : MGG* **257**: 205-212.
- Durrenberger, M., A. La Teana, G. Citro, F. Venanzi, C.O. Gualerzi & C.L. Pon, (1991) *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS is localized in the nucleoid. *Research in microbiology* **142**: 373-380.
- Edelman, R. & M.M. Levine, (1986) Summary of an international workshop on typhoid fever. *Reviews of infectious diseases* **8**: 329-349.
- Espinosa, E. & J. Casadesus, (2014) Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 (SPI-1) by the LysR-type regulator LeuO. *Molecular microbiology* **91**: 1057-1069.
- Ezezika, O.C., L.S. Collier-Hyams, H.A. Dale, A.C. Burk & E.L. Neidle, (2006) CatM regulation of the *benABCDE* operon: functional divergence of two LysR-type

- paralogs in *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Applied and environmental microbiology* **72**: 1749-1758.
- Ezezika, O.C., S. Haddad, E.L. Neidle & C. Momany, (2007) Oligomerization of BenM, a LysR-type transcriptional regulator: structural basis for the aggregation of proteins in this family. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* **63**: 361-368.
- Fahlen, T.F., N. Mathur & B.D. Jones, (2000) Identification and characterization of mutants with increased expression of *hilA*, the invasion gene transcriptional activator of *Salmonella typhimurium*. *FEMS immunology and medical microbiology* **28**: 25-35.
- Fang, M., A. Majumder, K.J. Tsai & H.Y. Wu, (2000) ppGpp-dependent *leuO* expression in bacteria under stress. *Biochemical and biophysical research communications* **276**: 64-70.
- Fang, M. & H.Y. Wu, (1998a) A promoter relay mechanism for sequential gene activation. *Journal of bacteriology* **180**: 626-633.
- Fang, M. & H.Y. Wu, (1998b) Suppression of *leu-500* mutation in *topA+* *Salmonella typhimurium* strains. The promoter relay at work. *The Journal of biological chemistry* **273**: 29929-29934.
- Fernandez-Mora, M., J.L. Puente & E. Calva, (2004) OmpR and LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* serovar Typhi *ompS2* porin gene. *Journal of bacteriology* **186**: 2909-2920.
- Fisher, R.F. & S.R. Long, (1993) Interactions of NodD at the *nod* Box: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. *Journal of molecular biology* **233**: 336-348.
- Flores-Valdez, M.A., J.L. Puente & E. Calva, (2003) Negative osmoregulation of the *Salmonella ompS1* porin gene independently of OmpR in an *hns* background. *Journal of bacteriology* **185**: 6497-6506.
- Gallego-Hernandez, A.L., I. Hernandez-Lucas, M.A. De la Cruz, L. Olvera, E. Morett, L. Medina-Aparicio, J.A. Ramirez-Trujillo, A. Vazquez, M. Fernandez-Mora & E. Calva, (2012) Transcriptional regulation of the *assT-dsbL-dsbI* gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Typhi IMSS-1 depends on LeuO, H-NS, and specific growth conditions. *Journal of bacteriology* **194**: 2254-2264.
- Goldberg, M.B. & R.H. Rubin, (1988) The spectrum of *Salmonella* infection. *Infectious disease clinics of North America* **2**: 571-598.
- Gong, W., G. Xiong & E. Maser, (2012) Oligomerization and negative autoregulation of the LysR-type transcriptional regulator HsdR from *Comamonas testosteroni*. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*.
- Gorshkov, V., O. Petrova, N. Gogoleva & Y. Gogolev, (2010) Cell-to-cell communication in the populations of enterobacterium *Erwinia carotovora* ssp. atroseptica SCRI1043 during adaptation to stress conditions. *FEMS immunology and medical microbiology* **59**: 378-385.
- Guadarrama, C. (2004) Estudio de la regulación de la expresión del gen *leuO* de *Salmonella typhi*.
- Guadarrama, C. (2007) Purificación de la porina OmpS1 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: Implicaciones en la regulación y en estudios de inmunidad protectora.

- Guadarrama, C., A. Medrano-Lopez, R. Oropeza, I. Hernandez-Lucas & E. Calva, (2014a) The *Salmonella enterica* Serovar Typhi LeuO Global Regulator Forms Tetramers: Residues Involved in Oligomerization, DNA Binding and Transcriptional Regulation. *Journal of bacteriology* **196**: 2143-2154.
- Guadarrama, C., T. Villaseñor & E. Calva, (2014b) The Subtleties and Contrasts of the LeuO Regulator in *Salmonella* Typhi: Implications in the Immune Response. *Frontiers in immunology* **5**: 581.
- Hernandez-Lucas, I. & E. Calva, (2012) The coming of age of the LeuO regulator. *Molecular microbiology* **85**: 1026-1028.
- Hernandez-Lucas, I., A.L. Gallego-Hernandez, S. Encarnacion, M. Fernandez-Mora, A.G. Martinez-Batallar, H. Salgado, R. Oropeza & E. Calva, (2008) The LysR-type transcriptional regulator LeuO controls expression of several genes in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Journal of bacteriology* **190**: 1658-1670.
- Hryniewicz, M.M. & N.M. Kredich, (1994) Stoichiometry of binding of CysB to the *cysJIIH*, *cysK*, and *cysP* promoter regions of *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **176**: 3673-3682.
- Jourdan, A.D. & G.V. Stauffer, (1998) Mutational analysis of the transcriptional regulator GcvA: amino acids important for activation, repression, and DNA binding. *Journal of bacteriology* **180**: 4865-4871.
- Kang, J.W., A.R. Kwon, D.H. Kim & E.C. Choi, (2001) Cloning and sequencing of the *astA* gene encoding arylsulfate sulfotransferase from *Salmonella typhimurium*. *Biological & pharmaceutical bulletin* **24**: 570-574.
- Kim, J.A., J.H. Park, M.A. Lee, H.J. Lee, S.J. Park, K.S. Kim, S.H. Choi & K.H. Lee, (2015) Stationary-phase induction of *vvpS* expression by three transcription factors: repression by LeuO and activation by SmcR and CRP. *Molecular microbiology* **97**: 330-346.
- Kim, Y.H., Y. Lee, S. Kim, J. Yeom, S. Yeom, B. Seok Kim, S. Oh, S. Park, C.O. Jeon & W. Park, (2006) The role of periplasmic antioxidant enzymes (superoxide dismutase and thiol peroxidase) of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the formation of biofilms. *Proteomics* **6**: 6181-6193.
- Klauck, E., J. Bohringer & R. Hengge-Aronis, (1997) The LysR-like regulator LeuO in *Escherichia coli* is involved in the translational regulation of *rpoS* by affecting the expression of the small regulatory DsrA-RNA. *Molecular microbiology* **25**: 559-569.
- Knapp, G.S. & J.C. Hu, (2009) The oligomerization of CynR in *Escherichia coli*. *Protein science : a publication of the Protein Society* **18**: 2307-2315.
- Knapp, G.S., J.W. Tsai & J.C. Hu, (2009) The oligomerization of OxyR in *Escherichia coli*. *Protein science : a publication of the Protein Society* **18**: 101-107.
- Kullik, I., J. Stevens, M.B. Toledano & G. Storz, (1995a) Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization. *Journal of bacteriology* **177**: 1285-1291.
- Kullik, I., M.B. Toledano, L.A. Tartaglia & G. Storz, (1995b) Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for oxidation and transcriptional activation. *Journal of bacteriology* **177**: 1275-1284.

- Lahiri, A., P. Das & D. Chakravorty, (2009) *Salmonella* Typhimurium: insight into the multi-faceted role of the LysR-type transcriptional regulators in *Salmonella*. *The international journal of biochemistry & cell biology* **41**: 2129-2133.
- Lawrenz, M.B. & V.L. Miller, (2007) Comparative analysis of the regulation of *rovA* from the pathogenic yersiniae. *Journal of bacteriology* **189**: 5963-5975.
- Lee, Y., H. Lee, J. Yim & D. Hwang, (1997) The binding of two dimers of IciA protein to the *dnaA* promoter 1P element enhances the binding of RNA polymerase to the *dnaA* promoter 1P. *Nucleic acids research* **25**: 3486-3489.
- Lochowska, A., R. Iwanicka-Nowicka, D. Plochocka & M.M. Hryniewicz, (2001) Functional dissection of the LysR-type CysB transcriptional regulator. Regions important for DNA binding, inducer response, oligomerization, and positive control. *The Journal of biological chemistry* **276**: 2098-2107.
- Lochowska, A., R. Iwanicka-Nowicka, J. Zaim, M. Witkowska-Zimny, K. Bolewska & M.M. Hryniewicz, (2004) Identification of activating region (AR) of *Escherichia coli* LysR-type transcription factor CysB and CysB contact site on RNA polymerase alpha subunit at the *cysP* promoter. *Molecular microbiology* **53**: 791-806.
- Lostroh, C.P. & C.A. Lee, (2001) The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **3**: 1281-1291.
- Maddocks, S.E. & P.C. Oyston, (2008) Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154**: 3609-3623.
- Majumder, A., M. Fang, K.J. Tsai, C. Ueguchi, T. Mizuno & H.Y. Wu, (2001) LeuO expression in response to starvation for branched-chain amino acids. *The Journal of biological chemistry* **276**: 19046-19051.
- Mastroeni, P., (2002) Immunity to systemic *Salmonella* infections. *Current molecular medicine* **2**: 393-406.
- Maxon, M.E., J. Wigboldus, N. Brot & H. Weissbach, (1990) Structure-function studies on *Escherichia coli* MetR protein, a putative prokaryotic leucine zipper protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7076-7079.
- Mecenas, J., P.E. Rouviere, J.W. Erickson, T.J. Donohue & C.A. Gross, (1993) The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes & development* **7**: 2618-2628.
- Mecenas, J., R. Welch, J.W. Erickson & C.A. Gross, (1995) Identification and characterization of an outer membrane protein, OmpX, in *Escherichia coli* that is homologous to a family of outer membrane proteins including Ail of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of bacteriology* **177**: 799-804.
- Medina-Aparicio, L., J.E. Rebollar-Flores, A.L. Gallego-Hernandez, A. Vazquez, L. Olvera, R.M. Gutierrez-Rios, E. Calva & I. Hernandez-Lucas, (2011) The CRISPR/Cas immune system is an operon regulated by LeuO, H-NS, and leucine-responsive regulatory protein in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Journal of bacteriology* **193**: 2396-2407.
- Mei, G.Y., X.X. Yan, A. Turak, Z.Q. Luo & L.Q. Zhang, (2010) AidH, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel N-acylhomoserine lactonase. *Applied and environmental microbiology* **76**: 4933-4942.

- Michael, B., J.N. Smith, S. Swift, F. Heffron & B.M. Ahmer, (2001) SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *Journal of bacteriology* **183**: 5733-5742.
- Mireles, J.R., 2nd, A. Toguchi & R.M. Harshey, (2001) *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of bacteriology* **183**: 5848-5854.
- Mittrucker, H.W. & S.H. Kaufmann, (2000) Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *Journal of leukocyte biology* **67**: 457-463.
- Momany, C. & E.L. Neidle, (2012) Defying stereotypes: the elusive search for a universal model of LysR-type regulation. *Molecular microbiology* **83**: 453-456.
- Monferrer, D., T. Tralau, M.A. Kertesz, I. Dix, M. Sola & I. Uson, (2010) Structural studies on the full-length LysR-type regulator TsaR from *Comamonas testosteroni* T-2 reveal a novel open conformation of the tetrameric LTTR fold. *Molecular microbiology* **75**: 1199-1214.
- Moorthy, S. & P.I. Watnick, (2005) Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Molecular microbiology* **57**: 1623-1635.
- Moreno-Eutimio, M.A., A. Tenorio-Calvo, R. Pastelin-Palacios, C. Perez-Shibayama, C. Gil-Cruz, R. Lopez-Santiago, I. Baeza, M. Fernandez-Mora, L. Bonifaz, A. Isibasi, E. Calva & C. Lopez-Macias, (2013) *Salmonella* Typhi OmpS1 and OmpS2 porins are potent protective immunogens with adjuvant properties. *Immunology* **139**: 459-471.
- Muraoka, S., R. Okumura, N. Ogawa, T. Nonaka, K. Miyashita & T. Senda, (2003) Crystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *Journal of molecular biology* **328**: 555-566.
- Muse, W.B. & R.A. Bender, (1999) The amino-terminal 100 residues of the nitrogen assimilation control protein (NAC) encode all known properties of NAC from *Klebsiella aerogenes* and *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **181**: 934-940.
- 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. *Molecular microbiology* **32**: 243-252.
- Otto, K. & M. Hermansson, (2004) Inactivation of *ompX* causes increased interactions of type 1 fimbriated *Escherichia coli* with abiotic surfaces. *Journal of bacteriology* **186**: 226-234.
- Pang, T., M.M. Levine, B. Ivanoff, J. Wain & B.B. Finlay, (1998) Typhoid fever--important issues still remain. *Trends in microbiology* **6**: 131-133.
- Pareja, E., P. Pareja-Tobes, M. Manrique, E. Pareja-Tobes, J. Bonal & R. Tobes, (2006) ExtraTrain: a database of Extragenic regions and Transcriptional information in prokaryotic organisms. *BMC microbiology* **6**: 29.
- Parsek, M.R., D.L. Shinabarger, R.K. Rothmel & A.M. Chakrabarty, (1992) Roles of CatR and cis,cis-muconate in activation of the *catBC* operon, which is involved in benzoate degradation in *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology* **174**: 7798-7806.
- Perez-Rueda, E. & J. Collado-Vides, (2000) The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic acids research* **28**: 1838-1847.

- Perez-Rueda, E. & J. Collado-Vides, (2001) Common history at the origin of the position-function correlation in transcriptional regulators in archaea and bacteria. *Journal of molecular evolution* **53**: 172-179.
- Popoff, M.Y., J. Bockemuhl & F.W. Hickman-Brenner, (1997) Supplement 1996 (no. 40) to the Kauffmann-White scheme. *Research in microbiology* **148**: 811-814.
- Puente, J.L., V. Flores, M. Fernandez, Y. Fuchs & E. Calva, (1987) Isolation of an ompC-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene* **61**: 75-83.
- Punta, M., P.C. Coggill, R.Y. Eberhardt, J. Mistry, J. Tate, C. Bournnell, N. Pang, K. Forslund, G. Ceric, J. Clements, A. Heger, L. Holm, E.L. Sonnhammer, S.R. Eddy, A. Bateman & R.D. Finn, (2012) The Pfam protein families database. *Nucleic acids research* **40**: D290-301.
- Raffatellu, M., D. Chessa, R.P. Wilson, C. Tukel, M. Akcelik & A.J. Baumler, (2006) Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infection and immunity* **74**: 19-27.
- Raffatellu, M., R.P. Wilson, S.E. Winter & A.J. Baumler, (2008) Clinical pathogenesis of typhoid fever. *Journal of infection in developing countries* **2**: 260-266.
- Revell, P.A. & V.L. Miller, (2000) A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica inv* gene and for virulence. *Molecular microbiology* **35**: 677-685.
- Rodriguez-Morales, O., M. Fernandez-Mora, I. Hernandez-Lucas, A. Vazquez, J.L. Puente & E. Calva, (2006) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *ompS1* and *ompS2* mutants are attenuated for virulence in mice. *Infection and immunity* **74**: 1398-1402.
- Rosario, C.J. & R.A. Bender, (2005) Importance of tetramer formation by the nitrogen assimilation control protein for strong repression of glutamate dehydrogenase formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of bacteriology* **187**: 8291-8299.
- Ruangprasert, A., S.H. Craven, E.L. Neidle & C. Momany, (2010) Full-length structures of BenM and two variants reveal different oligomerization schemes for LysR-type transcriptional regulators. *Journal of molecular biology* **404**: 568-586.
- Sainsbury, S., L.A. Lane, J. Ren, R.J. Gilbert, N.J. Saunders, C.V. Robinson, D.I. Stuart & R.J. Owens, (2009) The structure of CrgA from *Neisseria meningitidis* reveals a new octameric assembly state for LysR transcriptional regulators. *Nucleic acids research* **37**: 4545-4558.
- Sainsbury, S., J. Ren, N.J. Saunders, D.I. Stuart & R.J. Owens, (2012) Structure of the regulatory domain of the LysR family regulator NMB2055 (MetR-like protein) from *Neisseria meningitidis*. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* **68**: 730-737.
- Schell, M.A., (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annual review of microbiology* **47**: 597-626.
- Schell, M.A., P.H. Brown & S. Raju, (1990) Use of saturation mutagenesis to localize probable functional domains in the NahR protein, a LysR-type transcription activator. *The Journal of biological chemistry* **265**: 3844-3850.
- Secundino, I., C. Lopez-Macias, L. Cervantes-Barragan, C. Gil-Cruz, N. Rios-Sarabia, R. Pastelin-Palacios, M.A. Villasis-Keever, I. Becker, J.L. Puente, E. Calva & A. Isibasi, (2006) *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* **117**: 59-70.

- Shi, X. & G.N. Bennett, (1995) Effects of multicopy LeuO on the expression of the acid-inducible lysine decarboxylase gene in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **177**: 810-814.
- Shimada, T., A. Bridier, R. Briandet & A. Ishihama, (2011) Novel roles of LeuO in transcription regulation of *E. coli* genome: antagonistic interplay with the universal silencer H-NS. *Molecular microbiology* **82**: 378-397.
- Shimada, T., K. Yamamoto & A. Ishihama, (2009) Involvement of the leucine response transcription factor LeuO in regulation of the genes for sulfa drug efflux. *Journal of bacteriology* **191**: 4562-4571.
- Smirnova, I.A., C. Dian, G.A. Leonard, S. McSweeney, D. Birse & P. Brzezinski, (2004) Development of a bacterial biosensor for nitrotoluenes: the crystal structure of the transcriptional regulator DntR. *Journal of molecular biology* **340**: 405-418.
- Smith, J.N. & B.M. Ahmer, (2003) Detection of other microbial species by *Salmonella*: expression of the SdiA regulon. *Journal of bacteriology* **185**: 1357-1366.
- Soksawatmaekhin, W., A. Kuraishi, K. Sakata, K. Kashiwagi & K. Igarashi, (2004) Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **51**: 1401-1412.
- Sonnenfield, J.M., C.M. Burns, C.F. Higgins & J.C. Hinton, (2001) The nucleoid-associated protein StpA binds curved DNA, has a greater DNA-binding affinity than H-NS and is present in significant levels in *hns* mutants. *Biochimie* **83**: 243-249.
- Stancik, L.M., D.M. Stancik, B. Schmidt, D.M. Barnhart, Y.N. Yoncheva & J.L. Slonczewski, (2002) pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **184**: 4246-4258.
- Stec, E., M. Witkowska-Zimny, M.M. Hryniewicz, P. Neumann, A.J. Wilkinson, A.M. Brzozowski, C.S. Verma, J. Zaim, S. Wysocki & G.D. Bujacz, (2006) Structural basis of the sulphate starvation response in *E. coli*: crystal structure and mutational analysis of the cofactor-binding domain of the Cbl transcriptional regulator. *Journal of molecular biology* **364**: 309-322.
- Stratmann, T., S. Madhusudan & K. Schnetz, (2008) Regulation of the *yjjQ-bglJ* operon, encoding LuxR-type transcription factors, and the divergent *yjjP* gene by H-NS and LeuO. *Journal of bacteriology* **190**: 926-935.
- Stratmann, T., U. Pul, R. Wurm, R. Wagner & K. Schnetz, (2012) RcsB-BglJ activates the *Escherichia coli leuO* gene, encoding an H-NS antagonist and pleiotropic regulator of virulence determinants. *Molecular microbiology* **83**: 1109-1123.
- Sun, J. & A. Klein, (2004) A LysR-type regulator is involved in the negative regulation of genes encoding selenium-free hydrogenases in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Molecular microbiology* **52**: 563-571.
- Tanaka, K., S. Muramatsu, H. Yamada & T. Mizuno, (1991) Systematic characterization of curved DNA segments randomly cloned from *Escherichia coli* and their functional significance. *Molecular & general genetics : MGG* **226**: 367-376.
- Taylor, J.L., R.S. De Silva, G. Kovacikova, W. Lin, R.K. Taylor, K. Skorupski & F.J. Kull, (2012) The crystal structure of AphB, a virulence gene activator from *Vibrio cholerae*, reveals residues that influence its response to oxygen and pH. *Molecular microbiology* **83**: 457-470.

- Tenor, J.L., B.A. McCormick, F.M. Ausubel & A. Aballay, (2004) *Caenorhabditis elegans*-based screen identifies *Salmonella* virulence factors required for conserved host-pathogen interactions. *Current biology : CB* **14**: 1018-1024.
- Thony, B., D.S. Hwang, L. Fradkin & A. Kornberg, (1991) *iciA*, an *Escherichia coli* gene encoding a specific inhibitor of chromosomal initiation of replication *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 4066-4070.
- Toguchi, A., M. Siano, M. Burkart & R.M. Harshey, (2000) Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *Journal of bacteriology* **182**: 6308-6321.
- Tropel, D. & J.R. van der Meer, (2004) Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **68**: 474-500, table of contents.
- Turnbull, A.L., W. Kim & M.G. Surette, (2012) Transcriptional regulation of *sdia* by cAMP-receptor protein, LeuO, and environmental signals in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Canadian journal of microbiology* **58**: 10-22.
- Tyrrell, R., K.H. Verschuere, E.J. Dodson, G.N. Murshudov, C. Addy & A.J. Wilkinson, (1997) The structure of the cofactor-binding fragment of the LysR family member, CysB: a familiar fold with a surprising subunit arrangement. *Structure* **5**: 1017-1032.
- Ueguchi, C., T. Ohta, C. Seto, T. Suzuki & T. Mizuno, (1998) The *leuO* gene product has a latent ability to relieve *bgl* silencing in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **180**: 190-193.
- VanBogelen, R.A., E.R. Olson, B.L. Wanner & F.C. Neidhardt, (1996) Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **178**: 4344-4366.
- Verschuere, K.H., R. Tyrrell, G.N. Murshudov, E.J. Dodson & A.J. Wilkinson, (1999) Solution of the structure of the cofactor-binding fragment of CysB: a struggle against non-isomorphism. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**: 369-378.
- Weeks, J.N., C.L. Galindo, K.L. Drake, G.L. Adams, H.R. Garner & T.A. Ficht, (2010) *Brucella melitensis* VjbR and C12-HSL regulons: contributions of the N-dodecanoyl homoserine lactone signaling molecule and LuxR homologue VjbR to gene expression. *BMC microbiology* **10**: 167.
- Westra, E.R., U. Pul, N. Heidrich, M.M. Jore, M. Lundgren, T. Stratmann, R. Wurm, A. Raine, M. Mescher, L. Van Heereveld, M. Mastop, E.G. Wagner, K. Schnetz, J. Van Der Oost, R. Wagner & S.J. Brouns, (2010) H-NS-mediated repression of CRISPR-based immunity in *Escherichia coli* K12 can be relieved by the transcription activator LeuO. *Molecular microbiology* **77**: 1380-1393.
- Yamada, H., T. Yoshida, K. Tanaka, C. Sasakawa & T. Mizuno, (1991) Molecular analysis of the *Escherichia coli* *hns* gene encoding a DNA-binding protein, which preferentially recognizes curved DNA sequences. *Molecular & general genetics : MGG* **230**: 332-336.
- Zaidi, M.B., C.L. Macias & E. Calva, (2006) [Mexican studies on *Salmonella*: epidemiology, vaccines and molecular biology]. *Revista latinoamericana de microbiologia* **48**: 121-125.

- Zaim, J. & A.M. Kierzek, (2003) The structure of full-length LysR-type transcriptional regulators. Modeling of the full-length OxyR transcription factor dimer. *Nucleic acids research* **31**: 1444-1454.
- Zhou, X., Z. Lou, S. Fu, A. Yang, H. Shen, Z. Li, Y. Feng, M. Bartlam, H. Wang & Z. Rao, (2010) Crystal structure of ArgP from *Mycobacterium tuberculosis* confirms two distinct conformations of full-length LysR transcriptional regulators and reveals its function in DNA binding and transcriptional regulation. *Journal of molecular biology* **396**: 1012-1024.

11. ANEXO I

(Tablas)

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio

Cepa	Genotipo y/o características relevantes	Fuente o Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>recA1</i> ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, <i>gyrA96</i>	Gibco BRL
SU101	<i>E. coli</i> JL 1434, <i>lexA71::Tn5</i> (Def) <i>sulA211</i> Δ (<i>lacIPOZYA</i>) <i>169/F'</i> <i>lacI^f</i> <i>lacZ</i> Δ M15::Tn9 (op+/op+)	(Dmitrova <i>et al.</i> , 1998)
BL21/pLys21	F ⁻ <i>ompT</i> (<i>lon</i>) <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> <i>m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (λ DE3)	Invitrogen
S. entérica		
IMSS-1	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi 9,12, d, Vi; Aislado clínico en México	(Puente <i>et al.</i> , 1987)

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este estudio

Plásmidos	Genotipo y/o características relevantes	Fuente o Referencia
pFMTrc12	Plásmido pTrc99A modificado con el origen de replicación p15A1 <i>lacI ptrc</i> ; Ap ^r	(Fernandez-Mora <i>et al.</i> , 2004)
pFMTrcleuO-50	Plásmido derivado de pFMTrc12, contiene el gen <i>leuO</i> de <i>S. Typhi</i>	(De la Cruz <i>et al.</i> , 2007)
pLeuOL27A	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una sustitución por alanina en el residuo L27 de LeuO	Este estudio
pLeuOL46A	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una sustitución por alanina en el residuo L46 de LeuO	Este estudio
pLeuOS54A	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una sustitución por alanina en el residuo S54 de LeuO	Este estudio
pLeuOL60A	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una sustitución por alanina en el residuo L60 de LeuO	Este estudio
pLeuOT79A	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una sustitución por alanina en el residuo T79 de LeuO	Este estudio

pLeuOP139A	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una substitución por alanina en el residuo P139 de LeuO	Este estudio
pLeuOS310A	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una substitución por alanina en el residuo S310 de LeuO	Este estudio
pLeuOV311A	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una substitución por alanina en el residuo V311 de LeuO	Este estudio
pLeuOC312A	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una substitución por alanina en el residuo C312 de LeuO	Este estudio
pLeuOK313A	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una substitución por alanina en el residuo K313 de LeuO	Este estudio
pLeuOR314A	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una substitución por alanina en el residuo R314 de LeuO	Este estudio
pLeuO1-309	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una remoción de quince nucleótidos en el extremo 3' de <i>leuO</i>	Este estudio
pLeuO1-304	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una remoción de treinta nucleótidos en el extremo 3' de <i>leuO</i>	Este estudio
pLeuO1-299	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una remoción de cuarenta y cinco nucleótidos en el extremo 3' de <i>leuO</i>	Este estudio
pLeuO1-294	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una remoción de sesenta nucleótidos en el extremo 3' de <i>leuO</i>	Este estudio
pLeuO1-284	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una remoción de noventa nucleótidos en el extremo 3' de <i>leuO</i>	Este estudio
pLeuO1-214	Plásmido derivado de pFMTrcleuO-50, contiene una remoción de trescientos nucleótidos en el extremo 3' de <i>leuO</i>	Este estudio
pSR658-A	Vector que codifica la secuencia del DBD de LexA, usado para ensayos de homodimerización; Tcr oriV	(Daines & Silver, 2000)
pLexA-LeuO1-314	Plásmido derivado del pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO (gen <i>leuO</i> completo)	Este estudio
pLexA-LeuOL27A	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO-L27A (substitución por alanina en el residuo L27 en LeuO)	Este estudio
pLexA-LeuOL46A	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO-L46A (substitución por alanina en el residuo L46 en LeuO)	Este estudio
pLexA-LeuOS54A	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO-S54A (substitución por alanina en el residuo S54 en LeuO)	Este estudio

pLexA-LeuOL60	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO-L60A (substitución por alanina en el residuo L60 en LeuO)	Este estudio
pLexA-LeuOT79A	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO-T79A (substitución por alanina en el residuo T79 en LeuO)	Este estudio
pLexA-LeuOP139A	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO-P139A (substitución por alanina en el residuo P139 en LeuO)	Este estudio
pLexA-LeuOS310A	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO-S310A (substitución por alanina en el residuo S310 en LeuO)	Este estudio
pLexA-LeuOV311A	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO-V311A (substitución por alanina en el residuo V311 en LeuO)	Este estudio
pLexA-LeuOC312A	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO-C312A (substitución por alanina en el residuo C312 en LeuO)	Este estudio
pLexA-LeuOK313A	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO-K313A (substitución por alanina en el residuo K313 en LeuO)	Este estudio
pLexA-LeuOR314A	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO-R314A (substitución por alanina en el residuo R314 en LeuO)	Este estudio
pLexA-LeuO1-309	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO con una remoción de quince nucleótidos en el extremo 3' de <i>leuO</i>	Este estudio
pLexA-LeuO1-304	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO con una remoción de treinta nucleótidos en el extremo 3' de <i>leuO</i>	Este estudio
pLexA-LeuO1-299	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO y la remoción de cuarenta y cinco nucleótidos en el extremo 3' de <i>leuO</i>	Este estudio
pLexA-LeuO1-294	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO con una remoción de sesenta nucleótidos en el extremo 3' de <i>leuO</i>	Este estudio
pLexA-LeuO1-284	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO con una remoción de noventa nucleótidos en el extremo 3' de <i>leuO</i>	Este estudio
pLexA-LeuO1-214	Plásmido derivado de pSR658-A, contiene la fusión LexADBD-LeuO con una remoción de trecientos nucleótidos en el extremo 3' de <i>leuO</i>	Este estudio

pMPM-T6Ω	Plásmido derivado de pBR322, p15A ori, resistencia a tetraciclina, AraC represor/activador, Ω interposon	
pMPMLeuO-His	Plásmido derivado de pMPM-T6Ω, contiene el gen <i>leuO</i> con una etiqueta Hisx6, con el promotor pBAD	Este estudio
pMPMLeuO1-299	Plásmido derivado de pMPM-T6Ω, contiene una remoción de quince nucleótidos en el extremo 3' de <i>leuO</i> con una etiqueta Hisx6	Este estudio
pMPMLeuO1-284	Plásmido derivado de pMPM-T6Ω, contiene una remoción de treinta nucleótidos en el extremo 3' de <i>leuO</i> con una etiqueta Hisx6	Este estudio
pMPMLeuOS54A	Plásmido derivado de pMPM-T6Ω, contiene una sustitución por alanina en el residuo S54 de LeuO con una etiqueta Hisx6	Este estudio
pMPMLeuOT79A	Plásmido derivado de pMPM-T6Ω, contiene una sustitución por alanina en el residuo T79 de LeuO con una etiqueta Hisx6	Este estudio
pMPMLeuOP139A	Plásmido derivado de pMPM-T6Ω, contiene una sustitución por alanina en el residuo P139 de LeuO con una etiqueta Hisx6	Este estudio
pKK232-9 <i>ompS1</i>	Plásmido derivado de pKK232-9, contiene 706-bp río arriba y 60-bp río abajo del codón de inicio ATG de <i>ompS1</i>	(Hernandez-Lucas <i>et al.</i> , 2008)
pKK232-9 <i>tpx</i>	Plásmido derivado de pKK232-9, contiene 405-bp río arriba y 82-bp río abajo del codón de inicio ATG de <i>tpx</i>	(Hernandez-Lucas <i>et al.</i> , 2008)
pRO310	Plásmido derivado de pMC1871, contiene una fusión traduccional de <i>ompS1</i> al gen reporter <i>lacZ</i>	(Oropeza <i>et al.</i> , 1999)
pTEPLer1	Plásmido derivado de pMPM-T3, expresa un fragmento del gen <i>ler</i> desde un promotor <i>lac</i>	(Bustamante <i>et al.</i> , 2011)

Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este estudio

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3') y descripción	Referencia
LeuOL27A5'	GATTGAACCTAGCCACCGTGGTTCG	
LeuOL27A3'	CGAACACGGTGGCTAGGTTCAAATC	Este estudio
	Utilizados para la sustitución de Leucina 27 por Alanina	
LeuOL46A5'	CGCCACACGGCCGGAATGTCGC	
LeuOL46A3'	GCGACATCCGGCCGTGTGGGCG	Este estudio
	Utilizados para la sustitución de Leucina 46 por Alanina	

LeuO-15CH3'	TCATTAGGATCCTTAGTGTTGGTGGTGGTG TTTATCACGCCAGCCGCTT	GTG	Este estudio
	Utilizado para la remoción de 15 residuos de aa en el extremo carboxilo y generar una etiqueta de HisX6		
LeuO-20CH3'	TCATTAGGATCCTTAGTGTTGGTGGTGGTGGTGCGCTTCA TGCCAGGAAAGGT		Este estudio
	Utilizado para la remoción de 20 residuos de aa en el extremo carboxilo y generar una etiqueta de HisX6		
LeuO-30CH3'	TCATTAGGATCCTTAGTGTTGGTGGTGGTGGTG GTGGCTATTCAGTTTTAAAGGCAAC		Este estudio
	Utilizado para la remoción de 30 residuos de aa en el extremo carboxilo y generar una etiqueta de HisX6		
LeuO-100CH3'	TCATTAGGATCCTTAGTGTTGGTGGTGGTGGTGGTGAACAACC GCATGTTGTTTCATTAT		Este estudio
	Utilizados para la remoción de 100 residuos de aa en el extremo carboxilo y generar una etiqueta de HisX6		
<i>Trc99ACG3'</i>	CCAAAACAGGCAAGCTTGC		Este estudio
	Utilizado como oligonucleótido común para amplificar <i>leuO</i> , se une en el extremo 3' del vector p <i>Trc99A</i>		
<i>Trc99ACG5'</i>	CTGGCAAATATTCTGAAATG		Este estudio
	Utilizado como oligonucleótido común para amplificar <i>leuO</i> , se une en el extremo 5' del vector p <i>Trc99A</i>		
LeuO- <i>FBgl</i>	GGGAAAGATCTGCATGGCAGAGGTCAAA		Este estudio
	Utilizado para la construcción de las quimeras LexA-LeuO silvestre y mutantes, generando un sitio <i>Bgl</i>		
LeuO- <i>RKpn</i>	AAAGGTACCTTAGTGTTGGTGGTGGTG		Este estudio
	Utilizado para la construcción de las quimeras LexA-LeuO silvestre y mutantes, generando un sitio <i>Kpn</i>		
Ler- <i>Kpn</i>	GCTCAGGTACCGTTATCATTA		Bustamante, V. (No publicado)
	Utilizado para amplificar un segmento del gen estructural de <i>ler</i> de <i>E. coli</i> , enteropatogénica		
Ler-15F	TATTAAGCGGGATCCGGAGATTATTATTATG	Utilizado	Bustamante, V. (No publicado)
	para amplificar un segmento del gen estructural de <i>ler</i> de <i>E. coli</i> , entero patogénica		

310b-1	TAGCCTTTTATCATTATTTTATC Utilizado para amplificar la región reguladora del gen <i>ompSI</i> a partir del nucleótido -310	(Flores-Valdez <i>et al.</i> , 2003)
310-(+1)	CTACAAATTGATACTATTCTATG Utilizado para amplificar la región reguladora del gen <i>ompSI</i> , hasta nucleótido + 1	(De la Cruz <i>et al.</i> , 2007)
310b-3	CAAAGCATCAAATACATATAAAAA Utilizado para amplificar la región reguladora del gen <i>ompSI</i> a partir del nucleótido -226	(Flores-Valdez <i>et al.</i> , 2003)
310b-8	AATATGTAGCCACTTCAACAAAAC Utilizado para amplificar la región reguladora del gen <i>ompSI</i> , hasta nucleótido + 27	(Flores-Valdez <i>et al.</i> , 2003)

Tabla 5. Antibióticos (dosis utilizadas)

Ampicilina (Amp)	200.0 µg/mL
Cloranfenicol (Cm)	34.0 µg/mL
Kanamicina (Km)	30 µg/mL
Tetraciclina (Tc)	12 µg/mL
Ácido nalidíxico (Nal)	15.0 µg/mL

12. ANEXO II
(Artículos publicados)

The *Salmonella enterica* Serovar Typhi LeuO Global Regulator Forms Tetramers: Residues Involved in Oligomerization, DNA Binding, and Transcriptional Regulation

Carmen Guadarrama, Abraham Medrano-López, Ricardo Oropeza, Ismael Hernández-Lucas, Edmundo Calva

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

LeuO is a LysR-type transcriptional regulator (LTTR) that has been described to be a global regulator in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*, since it positively and negatively regulates the expression of genes involved in multiple biological processes. LeuO is comprised of an N-terminal DNA-binding domain (DBD) with a winged helix-turn-helix (wHTH) motif and of a long linker helix (LH) involved in dimerization that connects the DBD with the C-terminal effector-binding domain (EBD) or regulatory domain (RD; which comprises subdomains RD-I and RD-II). Here we show that the oligomeric structure of LeuO is a tetramer that binds with high affinity to DNA. A collection of single amino acid substitutions in the LeuO DBD indicated that this region is involved in oligomerization, in positive and negative regulation, as well as in DNA binding. Mutants with point mutations in the central and C-terminal regions of RD-I were affected in transcriptional activation. Deletion of the RD-II and RD-I C-terminal subdomains affected not only oligomerization but also DNA interaction, showing that they are involved in positive and negative regulation. Together, these data demonstrate that not only the C terminus but also the DBD of LeuO is involved in oligomer formation; therefore, each LeuO domain appears to act synergistically to maintain its regulatory functions in *Salmonella enterica* serovar Typhi.

The *leuO* gene is located between the *leuOABCD* and *ilvIH* operons (1), and its product is involved in the regulation of *leuOABCD* by a complex *cis*-acting promoter relay mechanism (2–4). The LeuO regulator belongs to the LysR-type transcriptional regulators (LTTRs) (5) and represses the expression of *DsrA* RNA and *cadAB* (6, 7); it is also involved in the activation of *bgl* and of the *yjQ-bglJ* operons in *Escherichia coli* (8–10) and *rovA* in *Yersinia* (11). In *Salmonella enterica* serovar Typhi, LeuO activates the expression of *ompS1* and *ompS2* (12, 13). Additionally, LeuO was reported to be a global regulator in *S. Typhi*, since it positively regulates the expression of *assT* and STY3070 (*casC*) and down-regulates *ompX*, *tpx*, and STY1978 (14–16). LeuO is involved in the virulence of *S. Typhimurium* both in a mouse model and in *Caenorhabditis elegans*, and its role in *Vibrio cholerae* biofilm formation has been reported (17–19).

The role of LeuO as an antagonist of the histone-like nucleoid structuring protein that can act as a transcription silencer (the H-NS protein) has been described in detail for *ompS1*, where it binds to two sites contained in the F+1 fragment described below, and for the CRISPR-Cas system (13–15, 20). It has also been reported to be a global H-NS protein antagonist in *E. coli*, *S. Typhimurium*, and *S. Typhi* (21, 22). To date, this role as an antagonist of the H-NS protein has not been reported for other LTTRs. Interestingly, LeuO is quiescent in a wild-type (wt) genomic background, due to the negative regulatory effect of the H-NS nucleoid-associated protein and transcriptional silencer, but its expression can be detected in stationary phase and when the levels of phosphate and amino acids are restricted (7, 23–25). More recently, it was shown that *leuO* expression in *E. coli* can be activated by the *RcsB* and *BglJ* regulators (26).

The LTTRs share features, such as their sequence length (300 to 350 residues) and the high sequence identity of the first 60 residues of the N terminus. These 60 residues are comprised of the DNA-binding domain (DBD) with a winged helix-turn-helix (wHTH)

motif and of a long linker helix (LH) that connects the DBD with the C-terminal effector-binding domain (EBD) or regulatory domain (RD). According to the standard nomenclature for the LTTR structure (27–30), RD comprises subdomain RD-I, which is located in the central part of the protein and at the C terminus, and subdomain RD-II, which separates the two parts of RD-I in the central part of the protein and at the C terminus.

The active form of most characterized LTTRs (NahR, CysB, OxyR, CbnR, DntR, ArgP, TsaR, and AphB) is a tetramer (28, 30–35). Nevertheless, there are some LTTRs, such as MetR, CatR, IlvY, NodD3, Nac, and IciA, that form dimers in solution, and this seems to be their active form (36–41). In addition, CrgA forms octamers, and hexamer formation was reported for HsdR (29, 42). Several studies suggest that the C-terminal domain of LTTRs is involved in multimerization, since repression and DNA binding are affected in NahR, CysB, or OxyR with deletions in the C terminus. These effects are thought to be due to defective oligomerization. Moreover, mutants with single point mutations in the C termini of OxyR and CysB were dimeric, indicating that this region is involved in tetramer formation. Interestingly, as dimers these mutants retained the capacity to repress and bind DNA (9, 31, 43–45). In contrast, mutants with deletions in the C-terminal regions of MetR and Nac were not affected in transcriptional regulation and in solution formed dimers that interacted with

Received 24 January 2014 Accepted 16 March 2014

Published ahead of print 21 March 2014

Address correspondence to Edmundo Calva, ecalva@ibt.unam.mx.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01484-14>.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.01484-14

DNA. These truncated proteins formed dimers, perhaps because they contain an intact LH that is involved in dimerization (28, 30, 36, 40).

In this work, the tetrameric form of the global regulatory protein LeuO is reported. By site-directed and deletion mutagenesis, protein-DNA interaction, transcriptional regulation activity, and oligomerization studies, we observed that each LeuO domain is important to maintenance of its properties.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table S1 in the supplemental material. *S. Typhi* IMSS-1 was grown in MA medium (7 g nutrient broth, 1 g yeast extract, 2 g glycerol, 3.75 g K_2HPO_4 , 1.3 g KH_2PO_4 , per liter). The *E. coli* strains were grown in LB medium (10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl per liter). When necessary, the following antibiotics were added to the medium: ampicillin (300 μ g/ml), kanamycin (30 μ g/ml), tetracycline (10 μ g/ml), and chloramphenicol (30 μ g/ml). The *E. coli* strains and *S. Typhi* were grown aerobically at 37°C.

DNA manipulation and plasmid construction. The oligonucleotides used in this study are listed in Table S2 in the supplemental material and were provided by the Oligonucleotide Synthesis Unit of the Institute of Biotechnology, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Plasmid isolation, restriction enzyme digestions, ligase reactions, transformations, and 5' end labeling of PCR fragments were performed using standard procedures. PCRs were performed with *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), and restriction and DNA-modifying enzymes were obtained from Roche, Fermentas, or New England BioLabs and used according to the manufacturers' instructions. The construction of deletions was carried out with oligonucleotides to attach NcoI and BamHI sites in frame to amplify the appropriate fragments out of full-length *leuO* using the pFMT r leuO-50 plasmid as the template, and the digested fragments were cloned into the pFMT r c12 vector (see Table S1 in the supplemental material). The PCRs used for site-directed mutagenesis of *leuO* to introduce alanine substitutions at residues L27, L46, S54, L60, T79, P139, S310, V311, C312, K313, and R314 were carried out with the appropriate pairs of primers (see Table S2 in the supplemental material) and the common upper primer 99ACG5' and lower primer 99CGA3' using the pFMT r leuO-50 plasmid as the template; the PCR products were digested with NcoI and BamHI and ligated into pFMT r c12. The plasmids used in the *leuO* wild type as the template. Deletions and point mutations in the coding sequence were obtained with the LeuO-FBgl and LeuO-RKpn primers. The fragments were cleaved with BglII-KpnI and cloned into plasmid pSR658-A (see Table S1 in the supplemental material). Plasmids pFMT r leuO-50, pLeuO-5C, pLeuO-30C, pLeuOS54A, pLeuOT79A, and pLeuOP139A were cleaved with NcoI and HindIII, and fragments were cloned into plasmid pMPM-T6 Ω ; all fragments had a C-terminal 6 \times His tag (see Table S1 in the supplemental material). The plasmids derived from pFMT r leuO-50, pSR658-A, and pMPM-T6 Ω were completely sequenced to verify the presence of the inserts.

Purification of LeuO wt and mutant proteins. For *in vitro* assays, the *S. Typhi* LeuO wt and different mutant proteins were overexpressed from plasmids derived from pMPM-T6 Ω in *E. coli* BL21(DE3) (see Table S1 in the supplemental material). The LeuO wt used for size exclusion chromatography was purified from a liter of LB medium and grown to mid-logarithmic phase, and 0.1% L-(+)-arabinose (Sigma-Aldrich) was added to activate expression. The culture was then incubated at 200 rpm at 37°C for 4 h. To purify the LeuO1-309, LeuO1-284, S54A, and P139A mutants, as well as the LeuO wt, the following conditions were used: cultures were grown in 200 ml of LB medium for 2 h at 37°C, and then 0.1% L-(+)-arabinose was added; the cultures were incubated at 200 rpm at 16°C for 20 h, and cells were pelleted by centrifugation. LeuO-6 \times His and the mutant His-tagged proteins were purified under native (nondenaturing) conditions, and the pellet was resuspended in purification buffer (50 mM

NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 mg/ml lysozyme, 0.1% Triton X-100) and disrupted by sonication. The supernatant was subjected to chromatography on nickel-agarose (Ni-nitrilotriacetic acid [NTA]; Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The column was washed with 10 volumes of resuspension buffer with 20 mM imidazole and then with a linear gradient of 20 to 300 mM imidazole. Fractions containing purified LeuO-6 \times His were selected for SDS-PAGE, loaded into a SLYDER-A-Lyzer 10K cassette (Pierce), dialyzed at 4°C against storage buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 0.1% Tween, 5 mM β -mercaptoethanol, 20% glycerol, pH 7.4), and stored at -20°C. The LeuO-6 \times His wt was purified under denaturing conditions as previously described (13), with some modifications. Briefly, the cells were suspended in lysis buffer (8 M urea, 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl [pH 8.0]) and disrupted by sonication; the supernatant was subjected to chromatography on nickel-agarose (Ni-NTA; Qiagen); and fractions containing purified LeuO-6 \times His were selected for SDS-PAGE, loaded onto the polyacrylamide gel, gradually dialyzed at 4°C against decreasing concentrations of urea (4, 1, and 0.2 M), and finally, dialyzed against storage buffer, as described above.

Size exclusion chromatography. Size exclusion chromatography was performed on an Akta system using a Sephacryl S-200 HR column (Amersham Biosciences). The column (volume, 320 ml) was loaded with 2 mg of LeuO wt protein contained in 3 ml of equilibration buffer. The column had previously been washed and equilibrated with 2 column volumes of 50 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, pH 7.4, and protein was eluted at a flow rate of 1.2 ml/min. Elution was monitored at 280 nm. The column was calibrated using blue dextran ($\geq 2,000$ kDa) to determine the void volume (V_0), as well as the following molecular mass standards (Sigma): cytochrome *c* (12.4 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), albumin (66 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), and β -amylase 145 (200 kDa). A calibration curve was obtained by plotting the logarithms of the molecular masses of the standards versus their respective V_e/V_0 values, where V_e corresponds to the elution volume of each standard. A linear regression with the values was performed to obtain the equation $y = 6,922.1e^{-3.0248x}$, which was used to calculate the relative molecular mass of LeuO, which was equal to $6,922.1e^{-3.0248 \times V_e/LeuO}$, by overlapping onto the standard curve. The LeuO wt purified under native conditions was loaded onto the column in two independent experiments, and its V_e was monitored. Only one major peak was observed.

β -Galactosidase assay. The *E. coli* SU101 strain harboring pSR658-A and LeuO derivative plasmids was grown overnight in LB medium with tetracycline at 37°C under aerobic conditions. It was then subcultured in LB medium with tetracycline (10 μ g/ml), kanamycin (30 μ g/ml), and IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; 1.0 mM). Cells were collected at an A_{600} of 1.0, and the pellets were stored for β -galactosidase and Western blot assays. The β -galactosidase and microplate protein concentrations were determined as previously described (46).

CAT assays. *S. Typhi* strain IMSS-1 harboring plasmid pKK232-9 (*ompS1*) or pKK232-9 (*tpx*), together with either plasmid pFMT r leuO-50, vector pFMT r c12, or derivative plasmids (see Table S1 in the supplemental material), was grown overnight in LB medium at 37°C under aerobic conditions with ampicillin (300 μ g/ml) and kanamycin (30 μ g/ml) and on the next day was subcultured in MA medium (100 ml) supplemented with ampicillin and kanamycin. IPTG was added to a final concentration of 100 μ M at 37°C under aerobic conditions, and bacteria were collected at early log phase ($A_{600} = 1.0$) for determination of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity and Western blotting. CAT activity and protein concentrations were determined as previously described (14, 47).

Western blotting and PAGE. For Western blot assays, samples were subjected to SDS-PAGE (15% polyacrylamide) and transferred to 0.45- μ m-pore-size polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon; Millipore) in a semidry electrophoresis unit (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% nonfat milk and incubated with anti-LexA antibody (Abcam), anti-LeuO polyclonal antibodies, and an anti-6 \times His (Roche)

or anti-DnaK (MBL International Corp.) monoclonal antibody. They were then washed with 1× phosphate-buffered saline, 0.05% Tween 20. Immunodetection was performed with a 1:10,000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated antirabbit or antimouse antibody (Pierce) for polyclonal or monoclonal antibodies, respectively, and a Western Lightning Plus-ECL chemiluminescence reagent kit was used according to the instructions of the manufacturer (PerkinElmer) in order to visualize the bands.

Protein electrophoresis was performed under native conditions in a 10% nondenaturing polyacrylamide gel with Tris-HCl, pH 8.8, but without SDS and with a Tris-glycine, pH 8.3, running buffer. LeuO-6×His (1.5 μg per lane) was loaded, and after the separation, the proteins were visualized following the first step of the enhanced-background (two-stage) rapid silver-staining protocol (48).

EMSA. The DNA fragment from positions −310 to +1 of the regulatory region of the *ompS1* gene (referred to here as the DNA F+1 fragment) and the *ler* structural fragment used as a negative control were generated by PCR with primers 310b-1 and 310-(+1) and primers *ler*-Kpn and *ler*-15F, respectively, using plasmids pRO310 and *pler*-T3 as the templates, respectively (see Tables S1 and S2 in the supplemental material). The conditions used for the binding reactions and electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were those described previously, and 100 ng of each fragment was used (13). The F+1 fragment was 5′ end labeled with [γ -³²P]dATP at 3,000 Ci mmol^{−1} (Amersham Corporation) using polynucleotide kinase (Invitrogen) and purified using a gel extraction kit (Qiagen). Mixtures for EMSA (20 μl) containing 15,000 cpm (see Fig. 2) and 20,000 cpm (see Fig. 5) of the end-labeled F+1 DNA fragment, poly(dI-dC) as a nonspecific competitor, and different concentrations of purified LeuO wt and S54A and P139A mutants were incubated for 20 min at 4°C and then subjected to electrophoresis on 6% polyacrylamide nondenaturing gels in 1× Tris borate-EDTA buffer (pH 8.0) for 3 h at 100 V. The dried gels were subjected to autoradiography to visualize the radiolabeled bands.

LexA-based genetic system. The LexA-based genetic system used to analyze the LeuO wt and the dimerization of the different mutants has been described previously (49, 50). The coding sequences were obtained by PCR with primers LeuO-FBgl and LeuO-RKpn (see Table S2 in the supplemental material) with *leuO* wt and mutant templates. The resulting fragments were cloned in frame as a BglII-KpnI fragment into the sequence encoding the LexA DNA-binding domain (LexA_{DBD}) in pSR658-A, generating plasmids coding for chimeric proteins constituted by LexA_{DBD} fused to either the LeuO wt or mutant derivatives (see Table S1 in the supplemental material). The resulting plasmids were verified by DNA sequencing and introduced into *E. coli* SU101, which contains a chromosomal *sulA::lacZ* fusion, to monitor the ability of the hybrid proteins to form functional LexA_{DBD} dimers, which in turn repress the expression of the *sulA::lacZ* fusion. The *E. coli* SU101 strain harboring pSR658-A or LexA_{DBD}-LeuO derivative plasmids was grown overnight in LB medium with tetracycline at 37°C under aerobic conditions. It was then subcultured in LB medium with tetracycline (10 μg/ml), kanamycin (30 μg/ml), and IPTG (1 mM) to induce expression of LexA_{DBD}-LeuO hybrid proteins. Cells were collected when the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) was 1.0, and the pellets were stored for β-galactosidase and Western blot assays.

RESULTS

S. Typhi LeuO forms tetramers that bind DNA with high affinity. To determine the oligomeric state of LeuO from *Salmonella enterica* serovar Typhi IMSS-1 (see Table S1 in the supplemental material), the *leuO* gene was cloned in pMPM-T6Ω, and LeuO was overexpressed and purified under native (nondenaturing) conditions (NCs), resulting in LeuO-6×His-NC. LeuO-6×His-NC was subjected to size exclusion chromatography, and a single peak giving an average relative mass of 140.75 kDa was detected. This was calculated using a previously calibrated column with molecular

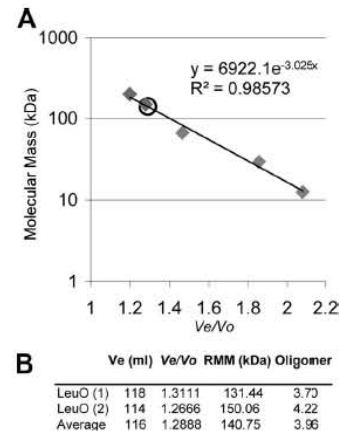


FIG 1 Size exclusion chromatography analysis of LeuO wt. The LeuO wt was purified under native conditions (2 mg/3 ml) and was loaded onto a Sephacryl S-200 column. (A) Calibration curve obtained by plotting the logarithms of the known molecular mass standards versus their respective V_e/V_o values. Blue dextran was used to determine the void volume (V_o) of the column (90 ml). The following protein standards are presented in the standard curve (gray diamonds) (their molecular masses, elution volumes [V_e], and V_e/V_o values are given in parentheses): β-amylase (200 kDa, 108 ml, 1.2), alcohol dehydrogenase (150 kDa, 117 ml, 1.3), albumin (66 kDa, 129 ml, 1.43), carbonic anhydrase (29 kDa, 167 ml, 1.86), and cytochrome *c* (12.4 kDa, 187 ml, 2.08). (B) LeuO V_e and V_e/V_o values obtained from two independent experiments and the average LeuO V_e and V_e/V_o values; the V_e value was incorporated into the standard curve (open circle in panel A). The relative molecular mass (RMM) of the LeuO wt was calculated using the equation described in Materials and Methods, and the oligomer size of LeuO was calculated as the relative molecular mass/35.7 kDa, where the latter value is the molecular mass of the LeuO monomer.

mass standards (Fig. 1A). This indicates that LeuO-6×His-NC is composed of four identical subunits (Fig. 1B) and that LeuO forms a tetramer in solution. Additionally, LeuO-6×His-NC showed only one intense band when analyzed in a native polyacrylamide gel, and that band corresponded to a tetramer (Fig. 2A). Western blot analysis of purified LeuO-6×His-NC with anti-His antibody revealed a single monomeric band of 35.7 kDa (Fig. 2B).

To analyze the ability of tetrameric LeuO-6×His-NC to bind DNA, a 350-bp DNA fragment (F+1) from the *ompS1* promoter region containing two LeuO binding sites (13) was used in an EMSA (Fig. 2C). The results depicted in Fig. 2D show that LeuO-6×His-NC binds at low concentrations, starting at 50 nM.

Previously, LeuO purified under denaturing conditions (LeuO-6×His-DC) did bind DNA, albeit at higher concentrations (13). The analysis of LeuO-6×His-DC in a native polyacrylamide gel showed other bands that migrated faster than the tetramer. The tetramer comigrated with the octameric form of the Ler regulator (a 16-kDa monomer), and the monomer comigrated with the Ler dimer (data not shown). The nature of the bands observed between the tetramer and the monomer is unknown and will be the subject of further studies regarding the structure of LeuO (Fig. 2A). LeuO-6×His-DC was purified to homogeneity according to the findings obtained with Coomassie blue-stained gels (not shown) and analysis by Western blotting (Fig. 2B). When analyzed for DNA binding, it required nearly 10-fold higher concentrations

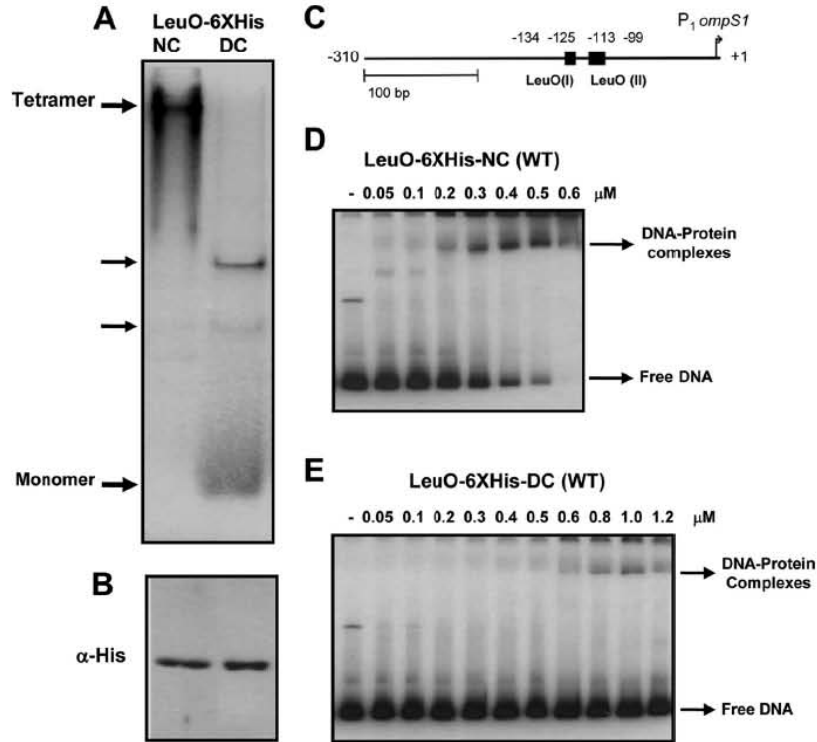


FIG 2 Tetrameric LeuO wt binds to DNA with a high affinity. The LeuO wt (1.5 μ g per lane) purified under native (LeuO6 \times His-NC) and denaturing (LeuO-6 \times His-DC) conditions was analyzed in a native 10% polyacrylamide gel (A), in a Western blot after SDS-PAGE with anti-His antibody (B), and by EMSA with different concentrations of LeuO6 \times His-NC (tetramer) (D) and LeuO-6 \times His-DC (monomer > dimer > trimer > tetramer) (E). (C) Schematic representation of the F+1 DNA fragment from the *ompS1* 5' regulatory region (13) used as a probe for EMSAs.

than LeuO-6 \times His-NC to interact with DNA (Fig. 2E). These results suggest that the tetrameric LeuO in the LeuO-6 \times His-NC samples binds to DNA with a higher affinity than the other LeuO forms found in LeuO-6 \times His-DC. In any event, care must be taken to purify LeuO under the appropriate native conditions in order to obtain the best activity.

Residues in LeuO DBD and LH are involved in oligomerization, while an RD-I central subdomain mutant has no effect on oligomer formation. The DBD is the most conserved region between LTTRs, and mutations in this domain affect DNA binding, activation, and repression. Furthermore, mutations in the DBDs of CysB, OxyR, and GcvA were not transdominant, and it has been suggested that they are affected in oligomer formation (43–45). The LH that is also conserved among LTTRs has a role in dimer formation, and the less conserved RD-I domain is involved in binding and a coinducer response (27–30).

The crystal structure of the characterized LTTRs has shown a similar fold for each subunit (monomer), and in several instances a stable active homotetramer formed as a dimer of dimers has been proposed to be necessary for the biological function of LTTRs (28–35, 51, 52). On the basis these findings, it seems that dimer formation is a process needed to obtain an active LeuO tetrameric form; therefore, we utilized the LexA-based genetic system of homodimerization to evaluate LeuO dimerization. This

genetic system was also used in order to be able to assess the oligomeric state of LTTRs since different mutated versions of LeuO constructed in this study could not be overexpressed and purified to homogeneity in the required amounts. This was the main limitation of this study, in spite of the fact that the LeuO wt protein was obtained in sufficient amounts (4 mg per liter of culture).

Hence, in order to determine the involvement of the DBD, the LH, and the RD-I central subdomain of LeuO in oligomerization, fragments with single alanine substitutions at six conserved residues were constructed (Fig. 3) and fused to LexA for dimerization analysis. The LexA-based genetic system detects *in vivo* protein dimerization in *E. coli* SU101, in which the reporter fusion *sulA::lacZ* is controlled by the LexA dimer (dimerization is essential for operator recognition) (50).

The DBD of LexA (residues 1 to 128) was fused to full-length *S. Typhi* LeuO (residues 1 to 314) and used as a positive control. This construct is referred to as LexA–LeuO1–314. In the reporter strain with the vector pSR658-A, the level of β -galactosidase activity reflects the level of constitutive expression of the *sulA::lacZ* fusion, and this level is presented as 100% *sulA* expression (Fig. 4B). The results showed that LexA–LeuO1–314 (wt) efficiently repressed *sulA::lacZ* expression (down to 5 to 10%) (Fig. 4B); thus, LeuO can replace the dimerization domain of LexA, and this system was used to probe LeuO dimerization *in vivo*. Six conserved residues,

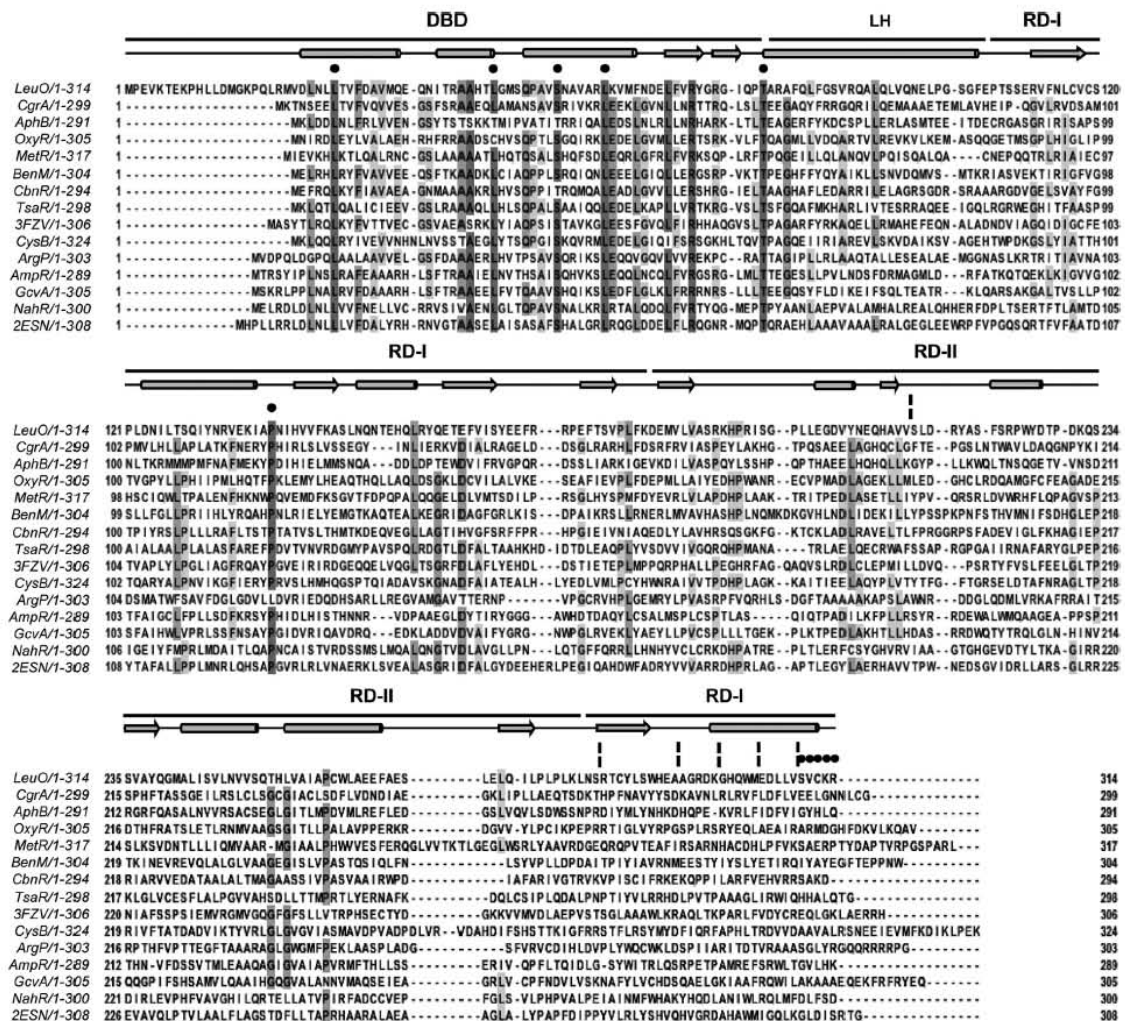


FIG 3 Multiple-sequence alignment of LeuO and several characterized LTRs. LeuO has a 20-residue extension at the N terminus when its sequence is aligned with the sequences of the other LTRs. The DNA-binding domain of LeuO comprises residues 21 to 78, the linker helix comprises residues 79 to 105, and the C-terminal regulatory domain comprises residues 106 to 314. Black circles and broken vertical lines highlight the replaced residues and deletions, respectively. The alignments and prediction of the secondary structure (in which the schematic representation above the sequences shows helices as cylinders, β sheets as arrows, and turn segments as lines) of LeuO were performed with the ClustalW and JalView programs (59). Dark gray and pale gray boxes show residues with the highest and the least identity, respectively. LysR family domains DBD, LH, and the C-terminal regulatory domain with two subdomains, RD-I (central, C terminal) and RD-II, are shown at the top. The amino acid sequences used in the alignment are as follows: LeuO (*S. enterica* serovar Typhi), CgrA (*Neisseria meningitidis*, GI 7188597), AphB (*V. cholerae*, GI 5565924), OxyR (*E. coli*, GI 388479299), MetR (*E. coli*, GI 388479422), BenM (*Acinetobacter baylyi* ADP1, GI 2996626), CbnR (*Ralstonia eutropha*, GI 4210464), TsaR (*Comamonas testosteroni* T-2, GI 75499536), CysB (*E. coli*, GI 1787530), ArgP (*Mycobacterium tuberculosis* H37v, GI 15609122), AmpP (*Citrobacter freundii*, GI 736669), GcvA (*E. coli*, GI 388478824), and NahR (*Pseudomonas putida*, GI 37220701). The PDB accession number for *P. aeruginosa* Q916S0 is 3FZV, and that for *P. aeruginosa* Q91641 is 2ESN.

L27, L46, S54, and L60 (located in the DBD), T79 (located one residue before the predicted LH), and P139A located in the RD-I central subdomain of LeuO (Fig. 3 and 4A), were replaced by alanine. The results showed *sulA::lacZ* expression of 65% for LexA-L27A, 85% for LexA-L46A and LexA-L60A, and 50% for LexA-T79A. Thus, these mutant proteins had a defective ability to

repress the expression of the *sulA::lacZ* reporter in strain SU101 compared with that of LexA-LeuO (wt) (Fig. 4B). In contrast, LexA-S54A, where S54A is located in the HTH motif, and LexA-P139A, where P139A is located in the RD-I central subdomain, repressed *sulA::lacZ* reporter expression as effectively as the LexA-LeuO wt (Fig. 4B). Western blot experiments

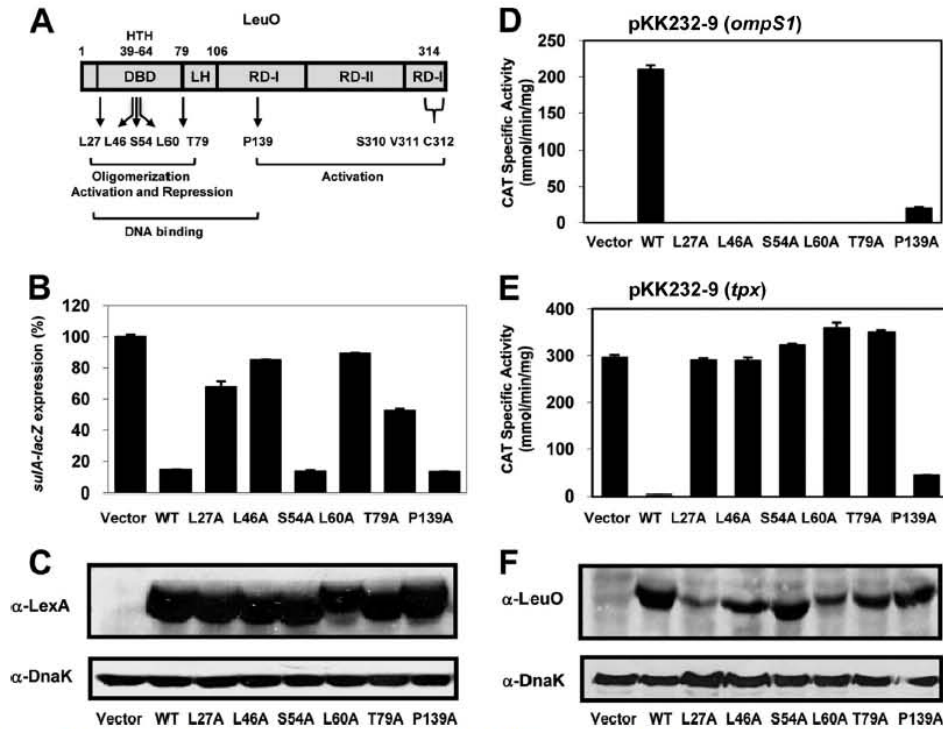


FIG 4 Analysis of the dimerization and regulatory functions of LeuO wt and different mutants with alanine-substituted residues in DBD and RD-I. (A) Schematic representation of the domains of the LysR family: DBD with the HTH motif, LH, and C-terminal regulatory domains RD-I (central and C terminal) and RD-II. The locations of the six alanine substitutions are also shown. (B) Dimerization analysis using the LexA-based two-hybrid system. *sulA::lacZ* expression was analyzed in strain SU101 carrying pSR658-A (vector), which reflects constitutive expression of the fusion and which was set equal to 100%, or pLexA-LeuOL27A, pLexA-LeuOL46A, pLexA-LeuOS54A, pLexA-LeuOL60A, pLexA-LeuOT79A, and pLexA-LeuOP139A. (C) Western blot assays of extracts prepared from cells carrying LexA-LeuO wt or LexA-alanine-substituted DBD and RD-I were carried out using anti-LexA antibody and anti-DnaK monoclonal antibody as a control after SDS-PAGE. The cultures were grown in LB to an OD_{600} of 1.0, and LexA-fused protein expression was induced with IPTG (1 mM). (D and E) The transcriptional profiles of fusions to the *cat* reporter gene for the *ompS1* (D) and *tpx* (E) genes in *S. Typhi* were evaluated in the presence of either the LeuO wt or mutants with six different alanine substitutions in DBD, LH, or RD-I: L27A, L46A, S54A, L60A, T79A, and P139A. (F) Expression of the LeuO wt and alanine-substituted mutants using an anti-LeuO polyclonal antibody and anti-DnaK monoclonal antibody as a control. The cultures were grown in MA medium to an OD_{595} of 1.0, and expression of the proteins was induced with IPTG (100 μ M).

showed similar levels of expression of LexA-LeuO wt and the LexA-fused mutants (Fig. 4C). These results showed that residues L27, L46, L60, and T79 are important in LeuO dimerization, while residues S54 and P139 do not affect dimerization, supporting the involvement of the DBD and LH regions in LeuO oligomerization.

LeuO DBD, LH, and RD-I central subdomain mutants are impaired in transcriptional activation and repression. To evaluate the effects of mutations in DBD, LH, and the RD-I central domain (Fig. 4A) on transcriptional activation or repression, the genes encoding the LeuO wt and the six alanine-substituted variants were cloned into pFMT r_{leuO} -50 (wt), pLeuOL27A, pLeuOL46A, pLeuOS54A, pLeuOL60A, pLeuOT79A, and pLeuOP139A, were introduced into strain IMSS-1 harboring the reporter plasmid pKK232-9 (*ompS1*) or pKK232-9 (*tpx*). The expression of *ompS1* and *tpx* (as regulatory regions fused to the *cat* gene) was activated or repressed in the presence of the LeuO wt, respectively (14). The results presented in Fig. 4D and E show that the L27A, L46A, S54A, L60A,

and T79A mutations rendered the proteins totally defective in activating or repressing the *ompS1* or *tpx cat* fusion, respectively.

A distinct phenotype was observed for the P139A mutant, whose ability to activate *ompS1* transcription was reduced by 10-fold compared to that of the wt (Fig. 4D), yet it was able to substantially repress *tpx* activity (Fig. 4E). This observation could mean that LeuO binds to DNA differently when it displaces the H-NS protein to turn on a gene than when it binds to impede transcription initiation. The elucidation of this hypothesis is certainly a matter for further research.

Western blot assays of cell extracts (Fig. 4F) showed that the L46A, S54A, T79A, and P139A mutant proteins were expressed at levels similar to the levels of expression of the LeuO wt, whereas the L27A and L60A mutant proteins were detected in smaller amounts, suggesting that they are more unstable. Nevertheless, their expression levels appeared to be sufficient to activate and repress transcription. These results indicate that the L27A, L46A, L60A, and T79A mutants lost their transcriptional function, aside

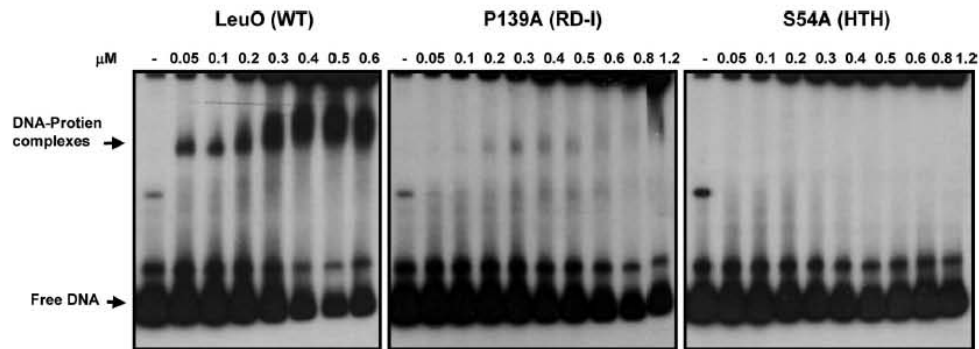


FIG 5 The P139A mutant binds to DNA with a low affinity. The results of EMSAs with the LeuO wt and the P139A and S54A mutants, which were purified under native conditions, bound to the 32 P-end-labeled F+1 DNA *ompS1* fragment are shown. Different concentrations of LeuO wt and mutant proteins were used, as indicated above each lane.

from the fact that they were affected in dimer formation (Fig. 4B). In contrast, the ability of the S54A mutant, which dimerized like the wt (Fig. 4B), to activate and repress transcription was abolished (Fig. 4D and E). This mutant is possibly defective in DNA binding since residue Ser54 is located in the HTH motif (Fig. 3 and 4A). The P139A mutant presented an interesting phenotype, since it dimerized (Fig. 4B), and although it retained only a low level of transcriptional activation, it maintained the capacity to almost fully repress transcription (Fig. 4D and E) and was expressed in amounts similar to those for the wt (Fig. 4F). This mutant protein probably maintains its ability to bind efficiently to *tpx* DNA but has less affinity for *ompS1* DNA. It should be pointed out that for the Western blot assays, the antibody against LeuO that was used was polyclonal; thus, a major reactive band was obtained over a background of other bands.

LeuO DBD, LH, and RD-I central subdomain mutants are defective in DNA binding. To ascertain the DNA-binding abilities of mutants with mutations in DBD, LH, and the RD-I central subdomain, alanine-substituted variants with six histidine residues in the C terminus were cloned into the pMPM-T6 Ω vector, in order to be overexpressed and purified under nondenatured conditions (see Materials and Methods). EMSAs were performed with the 350-bp DNA fragment (F+1) containing the *S. Typhi ompS1* promoter region and the LeuO-binding sites (13) and a *ler* DNA fragment of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) as a negative control (13, 46). By EMSA, the P139A mutant showed no detectable band with retarded migration (data not shown), even though it retained some activating and almost full repressing activity (Fig. 4D and E). However, in a more sensitive gel retardation experiment using a radioactive F+1 fragment, the P139A mutant did show DNA binding to the fragment, although at a much lower affinity than the LeuO wt (Fig. 5). Even with this more sensitive assay, no binding to DNA was observed with the S54A mutant. All these results showed that some residues in the DBD are involved in dimer formation and, thus, are most likely involved in tetramer formation, and these oligomeric defects alter the transcriptional function and DNA binding *in vitro*.

Deletions in the LeuO C-terminal RD-II and RD-I subdomains affect oligomerization. The C-terminal domains of LTTRs are involved in oligomerization, although the specific amino acid regions involved in tetramerization have not been de-

termined due to the poor conservation of this domain (53, 54). Accordingly, LeuO shares a high degree of sequence similarity with other LTTRs at the N-terminal DNA-binding domain and less conservation at the C-terminal inducer-binding domain (Fig. 3).

To determine the role of the C-terminal domain of LeuO in oligomer formation, a collection of sequentially truncated forms of LeuO fused to LexA was constructed. The selection of deletions was based on some that have been analyzed in other LTTRs (9, 31, 36, 40, 43–45). Thus, fragments of *leuO* encoding amino acid residues 1 to 309, 1 to 304, 1 to 299, 1 to 294, 1 to 284, and 1 to 214 (Fig. 6A), lacking 5, 10, 15, 20, 30, and 100 amino acids, respectively, were cloned into plasmid pSR658-A (see Materials and Methods), and strain SU101 was transformed with the resulting plasmids. The results presented in Fig. 6B show that all the truncated proteins fused to LexA were defective in repressing *sulA::lacZ* expression to various extents. The reporter gene expressions were 50% for pLexA-LeuO1-309, 70% for pLexA-LeuO1-304, 40% for pLexA-LeuO1-299, 60% for pLexA-LeuO1-294, 80% for pLexA-LeuO1-284, and 90% for pLexA-LeuO1-214. Thus, all the mutants had dimerization defects compared with the dimerization ability of LexA-LeuO wt (Fig. 6B).

Western blot assays of extracts prepared from cells carrying the LexA-LeuO wt and LexA-LeuO truncated proteins using anti-LexA antibody showed that all the proteins were expressed at levels similar to those of the wt, with the exception of LexA-LeuO1-214, which was expressed at very low levels (Fig. 6C). It was unexpected that all the LeuO truncated variants had dimerization defects, as they have an intact LH (which is involved in dimer formation) (28–30, 34, 35). The effect observed in the truncated protein lacking only 5 residues has not been observed for other LTTRs (40, 44, 45). This is clear evidence that the C-terminal RD-II and RD-I subdomains of LeuO are involved not only in tetramer formation but also in dimerization.

The transcriptional function of LeuO C-terminal variants with truncations in the RD-II and RD-I subdomains is completely abolished. To determine whether the proteins with truncations in the C terminus that are affected in dimer formation (Fig. 6B) are impaired in their transcriptional function *in vivo*, their capacity to activate or repress expression was explored. The various versions with deletions of the *leuO* gene were cloned into

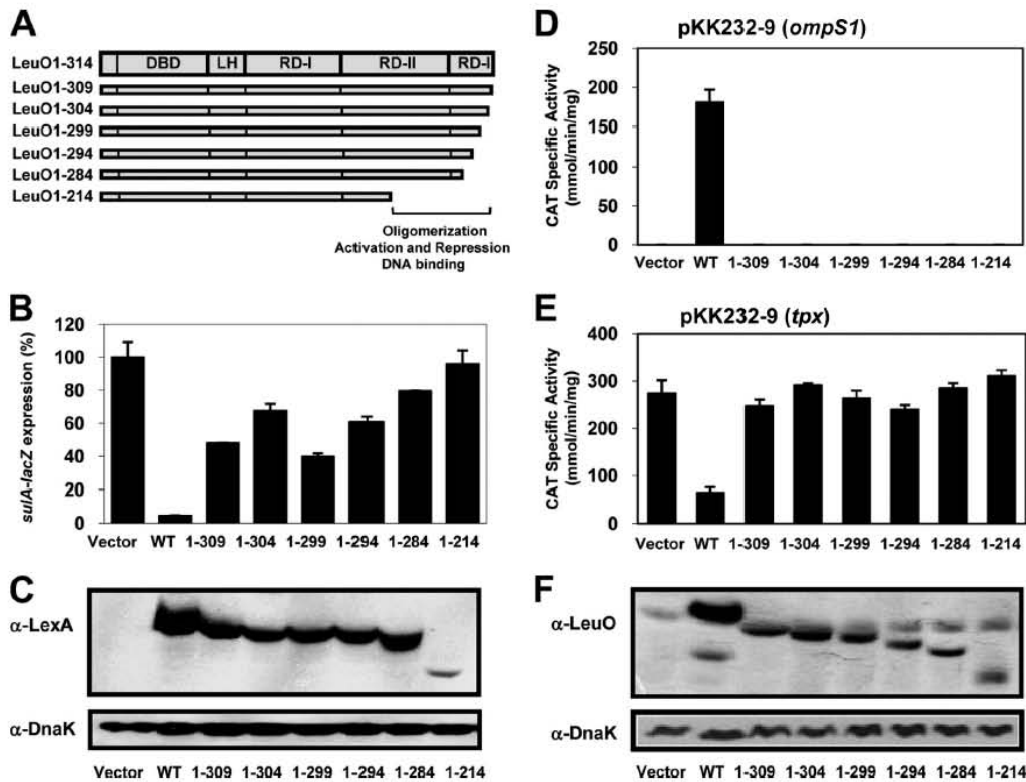


FIG 6 Analysis of dimerization and regulatory functions of LeuO wt and C-terminal deletion mutants. (A) Schematic representation of the domains of the LysR family: DBD, LH, and the C-terminal regulatory domain with two subdomains, RD-I (central, C terminal) and RD-II. The localization of the deletions in the C-terminal domain is also shown. (B) Dimerization analysis. *sulA-lacZ* expression in strain SU101 carrying pSR658-A (vector), the expression of which was set equal to 100%, or carrying pLexA-LeuO (wt), pLexA-LeuO1-309, pLexA-LeuO1-304, pLexA-LeuO1-299, pLexA-LeuO1-294, pLexA-LeuO1-284, or pLexA-LeuO1-214 is shown. (C) Expression of the LeuO wt and deletion mutants fused to LexA was evaluated by Western blotting using an anti-LexA polyclonal antibody and an anti-DnaK monoclonal antibody as a control after SDS-PAGE. The cultures were grown in LB medium to an OD_{600} of 1.0, and LexA-fused protein expression was induced with IPTG (1.0 mM). (D and E) Transcriptional profiles of fusions to the *cat* reporter gene for the *ompS1* and *tpx* genes in *S. Typhi* in the presence of either the LeuO wt or mutants with different deletions in the C terminus: LeuO1-309, LeuO1-304, LeuO1-299, LeuO1-294, LeuO1-284, and LeuO1-214. (F) Expression of the LeuO wt and the deletion mutants was evaluated by Western blotting using an anti-LeuO polyclonal antibody and an anti-DnaK monoclonal antibody as a control. The cultures were grown in MA medium to an OD_{595} of 1.0, and expression of the proteins was induced with IPTG (100 μ M).

plasmid pFMTrc12 (see Materials and Methods), and the resulting plasmids were named pLeuO1-309, pLeuO1-304, pLeuO1-299, pLeuO1-294, pLeuO1-284, and pLeuO1-214 (Fig. 6A). These were introduced into strain IMSS-1 harboring either plasmid pKK232-9 (*ompS1*) or plasmid pKK232-9 (*tpx*). As expected, in accordance with their dimerization defects, all truncated proteins were unable to activate or repress gene transcription (Fig. 6D and E).

To verify that the phenotypes observed for these truncated proteins were not due to very low or no expression, Western blot analysis with a polyclonal anti-LeuO antibody was performed, and it showed that the truncated proteins were expressed in amounts similar to those of the LeuO wt, with the exception of LeuO1-214, which was expressed at lower but still detectable levels that would appear to be sufficient for functionality (Fig. 6F). These results show that all the truncated proteins that are affected in dimerization are also completely defective in their regulatory function, and

this suggests that even though they have an intact DBD, they are also affected in DNA binding.

LeuO variants with C-terminal truncations fail to bind DNA. The DNA-binding capacity of two truncated proteins, LeuO1-309 and LeuO1-284, affected in dimerization (Fig. 6B) and in their regulatory function (Fig. 6D and E) was determined. The fragments encoding the LeuO1-309 and LeuO1-284 truncated proteins with six histidine residues in the C terminus were cloned into the pMPM-T6 Ω vector in order to be overexpressed and purified (see Materials and Methods). These two LeuO truncated variants were the ones that could be obtained at relatively higher yields for use in EMSAs using the 350-bp DNA fragment (F+1). The truncated proteins LeuO1-309 and LeuO1-284 did not form any detectable shifted bands; hence, they could not bind DNA even at the higher protein concentrations compared with the concentrations of LeuO wt used (data not shown).

All these observations show that the C- and N-terminal do-

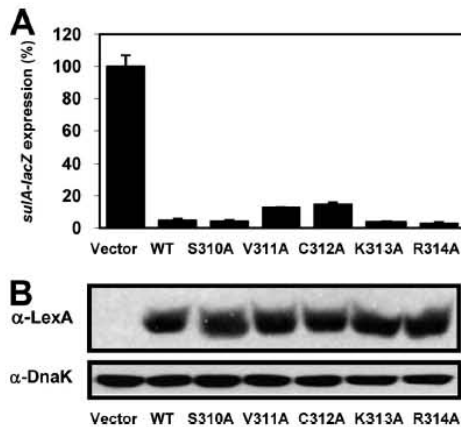


FIG 7 Dimerization analysis of mutants with single alanine substitutions of the last 5 residues of the RD-I subdomain at the C terminus by the LexA-based two-hybrid system. *sulA::lacZ* expression in strain SU101 carrying the pSR658-A (vector) was set equal to 100%. (A) Analyses of pLexA-LeuO (wt), pLexA-LeuOS310A, pLexA-LeuOV311A, pLexA-LeuOC312A, pLexA-LeuOK313A, and pLexA-LeuOR314A. (B) Western blot assay of extracts from cells carrying the LexA-LeuO wt and all the LexA-point mutants after SDS-PAGE. The gels were probed with anti-LexA antibody (top) and, for DnaK detection, with an anti-DnaK antibody as a control (bottom).

mains have a role in dimer formation and thus suggest that they have a role in tetramer formation and that the oligomeric state of LeuO is essential to exert transcriptional regulation and DNA binding.

LeuO mutants with point mutations in the last 5 residues of the C terminus are able to dimerize but are differentially affected in activation and repression. Given the dimerization defects of LexA-LeuO1-309C (Fig. 6B), it was of interest to know if proteins with single alanine substitutions in the last 5 residues showed the same phenotype. Using the two-hybrid system, we observed that all LexA-fused mutants with point mutations repressed expression of the *lacZ* reporter as efficiently as the LexA-LeuO wt; therefore, they maintained the capacity to dimerize (Fig. 7A). To verify the expression of the LexA-fused point mutants, a Western blot assay was performed using extracts of cells carrying LexA-LeuO wt and LexA-S310A, LexA-V311A, LexA-C312A, LexA-K313A, and LexA-R314A. As observed in Fig. 7B, all fused proteins were expressed at levels similar to the level for the LexA-LeuO wt, showing that they were stable and functional.

Next, the effect on the regulatory function of these mutants not affected in dimerization was analyzed. The five variants were cloned into pFM*Trc*12 (see Materials and Methods), generating plasmids pLeuOS310A, pLeuOV311A, pLeuOC312A, pLeuOK313A, and pLeuOR314A, which were introduced into strain IMSS-1 harboring plasmids pKK232-9 (*ompS1*) and pKK232-9 (*tpx*). Only the K313A and R314A mutants were able to activate the *ompS1-cat* fusion at a level similar to that for the LeuO wt; the S310A, V311A, and C312A mutants were not able to do so (Fig. 8A). Interestingly, all five variants repressed the *tpx-cat* fusion (Fig. 8B). Western blot analyses were performed to verify the expression of these mutant proteins at a level similar to that of the LeuO wt (Fig. 8C).

These results show that deletion of the last 5 LeuO residues of

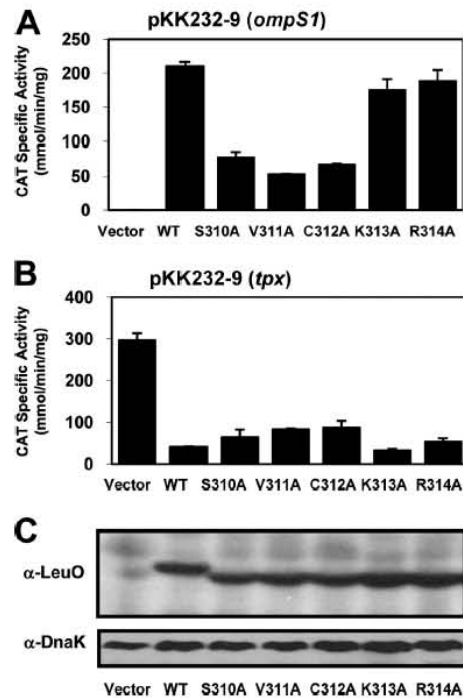


FIG 8 Effect of single alanine substitutions in the last 5 residues of the RD-I subdomain at the C terminus on LeuO regulatory functions. (A and B) Transcriptional profiles of *ompS1* and *tpx* genes in *S. Typhi* with the LeuO wt or with five mutants with different alanine-substituted residues: LeuOS310A, LeuOV311A, LeuOC312A, LeuOK313A, and LeuOR314A. (C) Expression of the LeuO wt and mutated proteins was evaluated by Western blotting after SDS-PAGE using an anti-LeuO polyclonal antibody and an anti-DnaK monoclonal antibody as a control. The cultures were grown in MA medium to an OD_{595} of 1.0, and expression of the proteins was induced with 100 μ M IPTG.

the RD-I terminal subdomain affects dimerization but that independent substitutions in each residue do not. Interestingly, mutants with two of these mutations (K313A and K314A) located at the end of the protein (Fig. 3) retained the capacity to activate and repress gene expression (Fig. 8A and B). In contrast, mutants with mutation of the remaining three residues that are part of the last predicted helix in LeuO (Fig. 3) still repressed but were affected in activating transcription (Fig. 8A and B). A similar phenotype was observed in the P139A mutant (Fig. 4D and E), in which the mutation was located in the RD-I central subdomain (Fig. 3). This indicates that residues in the RD-I central and terminal subdomains are involved in transcriptional activation.

DISCUSSION

In this work, the oligomeric structure of LeuO from *Salmonella enterica* serovar Typhi IMSS-1 was determined to be a tetramer (Fig. 1) that binds with high affinity to DNA (Fig. 2D). This oligomeric form was obtained when LeuO was purified under native conditions (LeuO-6 \times His-NC). In contrast, LeuO purified under denaturing conditions (LeuO-6 \times His-DC) bound to the same DNA with a lower affinity (Fig. 2E). Interestingly, both LeuO-6 \times His-NC and LeuO-6 \times His-DC showed DNA-protein com-

plexes with identical mobilities (Fig. 2D and E). LeuO-6×His-DC did not form complexes that migrated faster than those of LeuO-6×His-NC, even at higher protein concentrations, suggesting that in both cases the tetramer is the form that interacts with DNA (i.e., for LeuO-6×His-DC, the tetramer was present at very low concentration) or else that other oligomeric forms found in the LeuO-6×His-DC preparation bound with a low affinity, to result in complexes similar to those formed by the tetramer (Fig. 2E).

Curiously, DntR forms tetramers in solution and crystallizes as a homodimer (33). ArgP crystallizes as a dimer and also forms dimers in solution, but it has been proposed that it functions as a tetramer due to cooperative binding of dimers to dimers at two binding sites during DNA contact, thus enhancing the recruitment of RNA polymerase (30, 55). Other LTTRs, such as MetR, NodD3, and Nac, form functional dimers that have been shown to interact with DNA and activate or repress transcription. For these regulators, the C terminus appears to be dispensable for DNA-binding and transcriptional activity (36, 38, 40). Given this, it could be that LeuO binds to DNA as a dimer via a dimer-dimer interaction, which would be favored by the presence of DNA. Nevertheless, our findings suggest that the LeuO tetramer is the form that binds DNA *in vitro* (Fig. 2D and E). Therefore, LeuO is part of a subclass of LTTRs that includes NahR, TrpI, CysB, BenM, CbnR, DntR, TsaR, AphB, and ArgP, which have been shown to form homotetramers in solution. In most cases, the formation of an active homotetramer is necessary for their biological function (28–35, 51, 52).

Since the LeuO tetramer is required for DNA binding, the involvement of DBD, the C-terminal RD-I central and terminal subdomains, and the RD-II subdomain in oligomer formation was evaluated using alanine substitutions and deletions. Single alanine substitutions were constructed in six conserved residues in DBD and the RD-I central subdomain (Fig. 3). The L27A mutant (in which the mutation is located in an extended region of the N terminus), the L46A and L60A mutants (in which the mutation is within the HTH motif), and the T79A mutant (in which the mutation is proximal to the LH) had dimerization defects (Fig. 4B). As expected, these mutants were unable to activate and repress *ompS1* and *tpx* expression, respectively (Fig. 4D and E) and to interact with DNA (data not shown).

In agreement with these results, the K42E, R60E, and L71W mutants, whose mutations were located in the DBD and LH of ArgP, were shown to be involved in the dissociation of dimers into monomers, thus supporting the interactions between the C terminus and the DBD (30).

The S54A mutant (in which the mutation was located in the HTH) and the P139A mutant (in which the mutation was located in the region corresponding to RD-I) dimerized like the wt (Fig. 4B), so these mutants are likely to form tetramers.

Despite these findings, the S54A mutant was affected in transcriptional activation and DNA binding (Fig. 4D and E). Accordingly, residue Ser54, located in the HTH motif, is one of the most highly conserved residues in the recognition helix among LTTRs (Fig. 3), and these residues have been proposed to contact the DNA major groove (29). Ser54 corresponds to Ser35 in AmpR, Ser33 in OxyR, and Ser38 in CysB and GcvA, and these residues are required for DNA binding but not oligomerization (27, 43–45). On the other hand, the P139A mutant retained some ability to activate and almost fully repress transcription (Fig. 4D and E), and accordingly, it was able to bind to DNA *in vitro* but with less

affinity (Fig. 5). The P139 residue is located in the RD-I central subdomain (Fig. 3 and 4A), which is involved in binding and the inducer response in LTTRs (27, 56). However, it is not known whether LeuO requires an inducer *in vivo*. All these data show that some residues in the DBD of LeuO are involved in dimer formation, since Ala substitutions of these residues affected DNA binding and transcriptional activity. Therefore, this region could be important for dimer stability or in protein folding. Others residues in the DBD are not involved in oligomer formation yet are important for DNA binding and transcriptional function.

The C-terminal regulatory domain comprises the major portion of the LTTR proteins and contains two subdomains, RD-I and RD-II (Fig. 6A). Although the C-terminal regulatory domain is involved in oligomerization, the specific region involved has not been determined due to low levels of sequence conservation (Fig. 3). All truncated proteins in the C-terminal regulatory domain of LeuO were defective in dimerization (Fig. 6B), transcriptional activation and repression (Fig. 6D and E), and DNA binding *in vitro* (not shown). This held even in a mutant in which the last 5 C-terminal residues were deleted.

It was expected that the mutant with this deletion would retain the capacity to dimerize, since proteins with deletions of 5, 11, and 14 amino acids from the C termini of CysB, OxyR, and GcvA, respectively, function almost like the wild type or become constitutively active and are thus able to bind to DNA (43–45). Nevertheless, deletion of 9 residues from the C terminus of NahR severely affected transcription and DNA binding. Proteins lacking 16 or 22 residues in CysB and OxyR, respectively, were mainly affected in repression but were constitutively active. These truncated proteins formed dimers, suggesting that these regions are involved in tetramerization. A different effect was observed for mutants with a A233V point mutation in OxyR and a A227D point mutation in CysB, which still repressed and activated transcription constitutively and bound DNA as dimers (9, 31, 43–45).

All these results strongly suggest that several LysR regulators, including LeuO, function as tetramers and that the C terminus (the RD-I and RD-II subdomains) is important for proper oligomer formation.

Interestingly, a single alanine substitution in each of the last 5 residues of LeuO did not affect dimerization (Fig. 7A) or repression (Fig. 8B). This suggests that all five mutants retained the ability to bind DNA, since they were able to repress *tpx*. The S310A, V311A, and C312A mutants, which were affected in the ability to activate expression (Fig. 8A), could be affected in their ability to interact efficiently with the *ompS1* regulatory region, like the P139A mutant, which bound DNA with less affinity (Fig. 5), or could be affected in their capacity to displace the H-NS protein to derepress expression (13). Interestingly, these residues, like P139, are located in the RD-I C-terminal and central subdomain and are part of the last LeuO helix (Fig. 3).

The activation and repression mechanisms have been shown to be different depending on the oligomeric form of the Nac regulator: as a dimer it is capable of activating transcription and binding to DNA, and it weakly represses since it binds at one site, yet it needs to form a tetramer to promote strong repressive binding at two sites of the target regulatory region (57). Nevertheless, as discussed above, the LeuO tetramer binds with a high affinity to DNA *in vitro* and is the oligomeric form obtained under native purification conditions (Fig. 1 and Fig. 2A). The coexistence of dimers and tetramers described for Nac was not found for LeuO-NC, but

the possibility that some of the LeuO mutants studied here form dimers *in vivo* that retain the capacity to repress expression *in vivo* cannot be discarded. How these mutants are able to repress *tpx* expression but not efficiently activate *ompS1* is a matter for future study, since the mechanisms used by LTTRs for repression of target genes that are not oriented divergently from the regulator are poorly documented (56).

By analysis of mutants with site-directed and deletion mutations, we observed that LeuO shares some features with other characterized LTTRs, such as the functionality of its DBD and the involvement of the C-terminal domain, including the last 5 residues, in oligomerization. In addition, we found that each LeuO domain is also important in oligomerization, transcriptional regulatory functions, and protein-DNA interactions. These findings suggest a possible interaction between the C terminus and the DBD which might be important for the formation and stability of the dimer and, thus, for tetramer formation. Even though the LeuO sequence alignment with other LTTRs showed the conservation of domains and residues (Fig. 3), up to this point, further research on the three-dimensional structure of LeuO should help provide an understanding of whether its domains correspond to those previously defined for other LTTRs (Fig. 3). Therefore, complex structure-function relationships in LeuO may account for its regulatory functions, acting as a repressor, antirepressor, or activator of a wide variety of nonrelated genes, the number of which is increasing (21, 22, 58).

ACKNOWLEDGMENTS

E.C. was supported by grants from CONACyT, Mexico (no. 82383 and 179946). C.G. was supported by a predoctoral fellowship from CONACyT, Mexico (no. 184646), and from IHL DGAPA-UNAM (no. 1N-203312).

We thank Dimitris Georgellis and Alejandro Huerta for technical help in protein purification and gel filtration experiments, respectively; Marcos Fernández-Mora for the anti-LeuO polyclonal antibody; Ana Lucía Gallego-Hernández for providing plasmids pKK232-9 (*ompS1*) and pKK232-9 (*tpx*); Michael Dunn for revising the manuscript; and the Oligonucleotide Synthesis Facility of the Institute of Biotechnology, UNAM, for providing the oligonucleotides used in this study.

REFERENCES

- Hertzberg KM, Gemmill R, Jones J, Calvo JM. 1980. Cloning of an EcoRI-generated fragment of the leucine operon of *Salmonella typhimurium*. *Gene* 8:135–152. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(80\)90033-5](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(80)90033-5).
- Chen D, Bowater R, Dorman CJ, Lilley DM. 1992. Activity of a plasmid-borne *leu-500* promoter depends on the transcription and translation of an adjacent gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:8784–8788. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.89.18.8784>.
- Wu HY, Tan J, Fang M. 1995. Long-range interaction between two promoters: activation of the *leu-500* promoter by a distant upstream promoter. *Cell* 82:445–451. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90433-6](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90433-6).
- Wu HY, Fang M. 2003. DNA supercoiling and transcription control: a model from the study of suppression of the *leu-500* mutation in *Salmonella typhimurium topA* strains. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 73: 43–68. [http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6603\(03\)01002-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6603(03)01002-X).
- Henikoff S, Haughn GW, Calvo JM, Wallace JC. 1988. A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:6602–6606. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.85.18.6602>.
- Shi X, Bennett GN. 1995. Effects of multicopy LeuO on the expression of the acid-inducible lysine decarboxylase gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177:810–814.
- Klauck E, Böhlinger J, Hengge-Aronis R. 1997. The LysR-like regulator LeuO in *Escherichia coli* is involved in the translational regulation of *rpoS* by affecting the expression of the small regulatory DsrA-RNA. *Mol. Microbiol.* 25:559–569. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4911852.x>.
- Ueguchi C, Ohta T, Seto C, Suzuki T, Mizuno T. 1998. The *leuO* gene product has a latent ability to relieve *bgl* silencing in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180:190–193.
- Bartowsky E, Normark S. 1991. Purification and mutant analysis of *Citrobacter freundii* AmpR, the regulator for chromosomal AmpC β -lactamase. *Mol. Microbiol.* 5:1715–1725. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01920.x>.
- Stratmann T, Madhusudan S, Schnetz K. 2008. Regulation of the *yjiQ-bglJ* operon, encoding LuxR-type transcription factors, and the divergent *yjiP* gene by H-NS and LeuO. *J. Bacteriol.* 190:926–935. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01447-07>.
- Lawrenz MB, Miller VL. 2007. Comparative analysis of the regulation of *rovA* from the pathogenic yersiniae. *J. Bacteriol.* 189:5963–5975. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00528-07>.
- Fernández-Mora M, Puente JL, Calva E. 2004. OmpR and LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* serovar Typhi *ompS2* porin gene. *J. Bacteriol.* 186:2909–2920. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.10.2909-2920.2004>.
- De la Cruz MA, Fernández-Mora M, Guadarrama C, Flores-Valdez MA, Bustamante VH, Vázquez A, Calva E. 2007. LeuO antagonizes H-NS and StpA-dependent repression in *Salmonella enterica* *ompS1*. *Mol. Microbiol.* 66:727–743. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05958.x>.
- Hernández-Lucas I, Gallego-Hernández AL, Encarnación S, Fernández-Mora M, Martínez-Batallar AG, Salgado H, Oropeza R, Calva E. 2008. The LysR-type transcriptional regulator LeuO controls expression of several genes in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J. Bacteriol.* 190:1658–1670. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01649-07>.
- Medina-Aparicio L, Rebollar-Flores JE, Gallego-Hernández AL, Vázquez A, Olvera L, Gutiérrez-Ríos RM, Calva E, Hernández-Lucas I. 2011. The CRISPR/Cas immune system is an operon regulated by LeuO, H-NS, and leucine-responsive regulatory protein in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J. Bacteriol.* 193:2396–2407. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01480-10>.
- Gallego-Hernández AL, Hernández-Lucas I, De la Cruz MA, Olvera L, Morett E, Medina-Aparicio L, Ramírez-Trujillo JA, Vázquez A, Fernández-Mora M, Calva E. 2012. Transcriptional regulation of the *astT-dsB1-dsB1* gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Typhi IMSS-1 depends on LeuO, H-NS, and specific growth conditions. *J. Bacteriol.* 194:2254–2264. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.06164-11>.
- Lawley TD, Chan K, Thompson LJ, Kim CC, Govoni GR, Monack DM. 2006. Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog.* 2:e11. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0020011>.
- Rodríguez-Morales O, Fernández-Mora M, Hernández-Lucas I, Vázquez A, Puente JL, Calva E. 2006. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *ompS1* and *ompS2* mutants are attenuated for virulence in mice. *Infect. Immun.* 74:1398–1402. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.74.2.1398-1402.2006>.
- Moorthy S, Watnick PI. 2005. Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 57:1623–1635. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04797.x>.
- Westra ER, Pul U, Heidrich N, Jore MM, Lundgren M, Stratmann T, Wurm R, Raine A, Mescher M, Van Heereveld L, Mastop M, Wagner EG, Schnetz K, Van Der Oost J, Wagner N, Brouns SJ. 2010. H-NS-mediated repression of CRISPR-based immunity in *Escherichia coli* K12 can be relieved by the transcription activator LeuO. *Mol. Microbiol.* 77: 1380–1393. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07315.x>.
- Shimada T, Bridier A, Briandet R, Ishihama A. 2011. Novel roles of LeuO in transcription regulation of *E. coli* genome: antagonistic interplay with the universal silencer H-NS. *Mol. Microbiol.* 82:378–397. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07818.x>.
- Dillon SC, Espinosa E, Hokamp K, Ussery DW, Casadesús J, Dorman CJ. 2012. LeuO is a global regulator of gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* 85:1072–1089. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08162.x>.
- VanBogelen RA, Olson ER, Wanner BL, Neidhardt FC. 1996. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178:4344–4366.
- Fang M, Wu HY. 1998. Suppression of *leu-500* mutation in *topA*⁺ *Salmonella typhimurium* strains. The promoter relay at work. *J. Biol. Chem.* 273:29929–29934.
- Fang M, Majumder A, Tsai KJ, Wu HY. 2000. ppGpp-dependent *leuO*

- expression in bacteria under stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276:64–70. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.3440>.
26. Stratmann T, Pul U, Wurm R, Wagner R, Schnetz K. 2012. RcsB-BglJ activates the *Escherichia coli* *leuO* gene, encoding an H-NS antagonist and pleiotropic regulator of virulence determinants. *Mol. Microbiol.* 83: 1109–1123. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.07993.x>.
 27. Schell MA. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:597–626. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.47.100193.003121>.
 28. Muraoka S, Okumura R, Ogawa N, Nonaka T, Miyashita K, Senda T. 2003. Crystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J. Mol. Biol.* 328:555–566. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00312-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00312-7).
 29. Sainsbury S, Lane LA, Ren J, Gilbert RJ, Saunders NJ, Robinson CV, Stuart DI, Owens RJ. 2009. The structure of CrgA from *Neisseria meningitidis* reveals a new octameric assembly state for LysR transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* 37:4545–4558. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkp445>.
 30. Zhou X, Lou Z, Fu S, Yang A, Shen H, Li Z, Feng Y, Bartlam M, Wang H, Rao Z. 2010. Crystal structure of ArgP from *Mycobacterium tuberculosis* confirms two distinct conformations of full-length LysR transcriptional regulators and reveals its function in DNA binding and transcriptional regulation. *J. Mol. Biol.* 396:1012–1024. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.12.033>.
 31. Schell MA, Brown PH, Raju S. 1990. Use of saturation mutagenesis to localize probable functional domains in the NahR protein, a LysR-type transcription activator. *J. Biol. Chem.* 265:3844–3850.
 32. Hryniewicz MM, Kredich NM. 1994. Stoichiometry of binding of CysB to the *cysIII*, *cysK*, and *cysP* promoter regions of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 176:3673–3682.
 33. Smirnova IA, Dian C, Leonard GA, McSweeney S, Birse D, Brzezinski P. 2004. Development of a bacterial biosensor for nitrotoxicity: the crystal structure of the transcriptional regulator DntR. *J. Mol. Biol.* 340:405–418. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.04.071>.
 34. Monferrer D, Tralau T, Kertesz MA, Dix I, Sola M, Uson I. 2010. Structural studies on the full-length LysR-type regulator TsaR from *Comamonas testosteroni* T-2 reveal a novel open conformation of the tetrameric LTTR fold. *Mol. Microbiol.* 75:1199–1214. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07043.x>.
 35. Taylor JL, De Silva RS, Kovacicova G, Lin W, Taylor RK, Skorupski K, Kull FJ. 2012. The crystal structure of AphB, a virulence gene activator from *Vibrio cholerae*, reveals residues that influence its response to oxygen and pH. *Mol. Microbiol.* 83:457–470. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07919.x>.
 36. Maxon ME, Wigboldus J, Brot N, Weissbach H. 1990. Structure-function studies on *Escherichia coli* MetR protein, a putative prokaryotic leucine zipper protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:7076–7079. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.18.7076>.
 37. Parsek MR, Shinabarger DL, Rothmel RK, Chakrabarty AM. 1992. Roles of CatR and *cis,cis*-muconate in activation of the *catBC* operon, which is involved in benzoate degradation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 174:7798–7806.
 38. Fisher RF, Long SR. 1993. Interactions of NodD at the *nod* box: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA. *J. Mol. Biol.* 233:336–348. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1993.1515>.
 39. Bender RA. 1991. The role of the NAC protein in the nitrogen regulation of *Klebsiella aerogenes*. *Mol. Microbiol.* 5:2575–2580. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01965.x>.
 40. Muse WB, Bender RA. 1999. The amino-terminal 100 residues of the nitrogen assimilation control protein (NAC) encode all known properties of NAC from *Klebsiella aerogenes* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 934–940.
 41. Thöny B, Hwang DS, Fradkin L, Kornberg A. 1991. *iciA*, an *Escherichia coli* gene encoding a specific inhibitor of chromosomal initiation of replication *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:4066–4070. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.10.4066>.
 42. Gong W, Xiong G, Maser E. 2012. Oligomerization and negative autoregulation of the LysR-type transcriptional regulator HsdR from *Comamonas testosteroni*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 132:203–211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.05.012>.
 43. Kullik I, Stevens J, Toledano MB, Storz G. 1995. Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization. *J. Bacteriol.* 177:1285–1291.
 44. Lochowska A, Iwanicka-Nowicka R, Plochocka D, Hryniewicz MM. 2001. Functional dissection of the LysR-type CysB transcriptional regulator. Regions important for DNA binding, inducer response, oligomerization, and positive control. *J. Biol. Chem.* 276:2098–2107. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M007192200>.
 45. Jourdan AD, Stauffer GV. 1998. Mutational analysis of the transcriptional regulator GcvA: amino acids important for activation, repression, and DNA binding. *J. Bacteriol.* 180:4865–4871.
 46. Flores-Valdez MA, Puente JL, Calva E. 2003. Negative osmoregulation of the *Salmonella ompS1* porin gene independently of OmpR in an *hns* background. *J. Bacteriol.* 185:6497–6506. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.185.22.6497-6506.2003>.
 47. Martínez-Laguna Y, Calva E, Puente JL. 1999. Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 33: 153–166. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01460.x>.
 48. Joo WA, Speicher DW. 2007. Protein detection in gels without fixation. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Chapter 10:Unit 10.6. <http://dx.doi.org/10.1002/0471140864.ps1006s48>.
 49. Daines DA, Silver RP. 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.182.18.5267-5270.2000>.
 50. Dmitrova M, Younes-Cauet G, Oertel-Buchheit P, Porte D, Schnarr M, Granger-Schnarr M. 1998. A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 257:205–212. <http://dx.doi.org/10.1007/s004380050640>.
 51. Bundy BM, Collier LS, Hoover TR, Neidle EL. 2002. Synergistic transcriptional activation by one regulatory protein in response to two metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:7693–7698. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.102605799>.
 52. Ruangprasert A, Craven SH, Neidle EL, Momany C. 2010. Full-length structures of BenM and two variants reveal different oligomerization schemes for LysR-type transcriptional regulators. *J. Mol. Biol.* 404:568–586. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.053>.
 53. Knapp GS, Hu JC. 2009. The oligomerization of CynR in *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 18:2307–2315. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.241>.
 54. Knapp GS, Tsai JW, Hu JC. 2009. The oligomerization of OxyR in *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 18:101–107. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.5>.
 55. Lee Y, Lee H, Yim J, Hwang D. 1997. The binding of two dimers of IciA protein to the *dnaA* promoter 1P element enhances the binding of RNA polymerase to the *dnaA* promoter 1P. *Nucleic Acids Res.* 25:3486–3489. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.17.3486>.
 56. Maddocks SE, Oyston PC. 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 154: 3609–3623. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2008/022772-0>.
 57. Rosario CJ, Bender RA. 2005. Importance of tetramer formation by the nitrogen assimilation control protein for strong repression of glutamate dehydrogenase formation in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 187: 8291–8299. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.24.8291-8299.2005>.
 58. Hernández-Lucas I, Calva E. 2012. The coming of age of the LeuO regulator. *Mol. Microbiol.* 85:1026–1028. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08175.x>.
 59. Clamp M, Cuff J, Searle SM, Barton GJ. 2004. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics* 20:426–427. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btg430>.



The subtleties and contrasts of the LeuO regulator in *Salmonella* Typhi: implications in the immune response

Camen Guadarrama¹, Tomás Villaseñor² and Edmundo Calva^{1*}

¹ Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico

² Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico

Edited by:

Adam F. Cunningham, University of Birmingham, UK

Reviewed by:

Xun Suo, China Agricultural University, China
Heinrich Korner, Menzies Research Institute Tasmania, Australia

*Correspondence:

Edmundo Calva, Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico
e-mail: ecalva@ibt.unam.mx

Salmonella are facultative intracellular pathogens. *Salmonella* infection occurs mainly by expression of two *Salmonella* pathogenicity Islands (SPI-1 and SPI-2). SPI-1 encodes transcriptional factors that participate in the expression of virulence factors encoded in the island. However, there are transcriptional factors encoded outside the island that also participate in the expression of SPI-1-encoded genes. Upon infection, bacteria are capable of avoiding the host immune response with several strategies that involve several virulence factors under the control of transcriptional regulators. Interestingly, LeuO a transcriptional global regulator which is encoded outside of any SPI, is proposed to be part of a complex regulatory network that involves expression of several genes that help bacteria to survive stress conditions and, also, induces the expression of porins that have been shown to be immunogens and can thus be considered as antigenic candidates for acellular vaccines. Hence, the understanding of the LeuO regulon implies a role of bacterial genetic regulation in determining the host immune response.

Keywords: LeuO, Typhi, OmpS1, OmpS2, H-NS, porins

INTRODUCTION

Salmonella enterica are Gram-negative bacterial pathogens capable of infecting human beings and other vertebrates, and causing substantial morbidity and mortality (1, 2). In human beings, most of *Salmonella* serovars can cause infections in the small intestine and hence gastroenteritis; yet a small percentage of *Salmonella* serovars can cause a systemic infection, such as typhoid fever by the Typhi serovar (3). Control of *Salmonella* infection is difficult, in part due to the capacity of the bacterium to tolerate environmental stress, to its widespread distribution, multiple drug resistance, and adaptability (4). They infect human beings and other animals by the fecal-oral route, via contaminated food and water.

After oral acquisition, *Salmonella* resists low pH in the stomach and colonizes the intestinal tract and some cells can disseminate to cause systemic infection of organs such as liver and spleen (1). *Salmonella* virulence factors as well as host immune responses are determinant in the infectious process developed in the pathology (5). *S. enterica* Typhimurium and Typhi serovars interact with host cells through the activities mainly of two type three secretion systems (TTSS), encoded in two pathogenicity islands, 1 and 2 (SPI-1 and SPI-2) (6, 7). While SPI-1 participates in bacterial cell entry into non-phagocytic epithelial cells, SPI-2 is required for intracellular maintenance of the bacteria in a specialized membranous compartment (8). *Salmonella* internalization is mediated by effectors encoded in SPI-1: SopE, SopE2, and SopB, which activate the Rho family of GTPases Rac1, Cdc42 and RhoG (9, 10). These bacterial effectors promote a transcriptional reprogramming in host cells, which in turn leads to the expression of pro-inflammatory cytokines, which could be essential for the initiation of diarrhea, a hallmark of acute *Salmonella* infection. Recently, it has been observed that the expression of the

pro-inflammatory cytokine interleukin 22 (IL-22) can be exploited by pathogens, such as *Salmonella*, to suppress the growth of their closest competitors thereby enhancing pathogen colonization of mucosal surfaces (11–13).

Upon infection of intestinal epithelial cells, early transcriptional host responses occur characteristically after the stimulation of the innate immune receptors (14). However, the *Salmonella*-induced responses are unique in that this pathogen is capable of stimulating them independently of innate immune receptors (12), which are largely inactive in the intestinal epithelial cells due to robust negative regulatory mechanisms (15–17). After internalization in epithelial cells, bacteria traverse the intestinal epithelium and can invade M-cells overlying Peyer's patches, as well as being captured by dendritic cells directly from the intestinal lumen (18).

Systemic infection requires intracellular survival and replication, while *Salmonella*-macrophage interactions are essential for bacterial virulence, disease, pathology and chronic infection (19–21). Immunity to intra-macrophage pathogens (i.e., *Salmonella*) requires the infected host to generate a robust and sustained CD4 Th1 response (22). *Salmonella* infection of inbred mouse strains induces a robust CD4⁺ T-cell response that is essential toward protective immunity to secondary infection (23–27). *Salmonella* also induces CD8⁺ T-cells and antibody responses that can contribute to the resolution of infection (25, 27, 28). The first study to successfully characterize *Salmonella*-specific CD4⁺ T-cell clones identified the target antigen of these T-cells as an I-Ak epitope within the central hypervariable portion of bacterial flagellin encoded by the *FliC* gene (29). Subsequently, additional MHC class II epitopes were identified in the same protein and thus flagellin remains the most thoroughly defined target antigen in the *Salmonella* infection model (30, 31). Additional studies have

shown that immunization with flagellin provides a modest degree of protective immunity to *Salmonella* infection, usually defined by slightly lower bacterial counts or a delay in time to death after infection. Thus, flagellin is a well-defined target antigen of CD4⁺ T-cells during *Salmonella* infection and this response contributes modestly to protective immunity *in vivo* (32, 33). Among other antigens, the outer membrane proteins (OMPs) are particularly important. In a murine model, the highly abundant OmpC and OmpF porins (34) can induce long-term antibody responses with high bactericidal capacity, and they even confer protection against challenge with *Salmonella* Typhi (35, 36).

THE LeuO GLOBAL REGULATOR IS AN LTTR

LeuO is part of the LysR-type transcriptional regulators (LTTRs), the largest family of transcriptional regulators in prokaryotes. In consequence, they regulate a wide variety of genes that are involved in a diversity of cellular functions such as biosynthesis of amino acids, catabolism of aromatic compounds, antibiotic resistance, oxidative stress response, nitrogen fixation, quorum sensing and virulence (Figure 1) (37–40). Many structural studies have shown an organization of an N-terminal DNA-binding domain (DBD) with a winged Helix-Turn-Helix (wHTH) motif; and a long linker helix (LH) involved in dimerization that connects the DBD

with the C-terminal effector binding domain (EBD) or regulatory domain (RD) (37, 41–43). These regulators are proteins between 300 and 350 residues, mostly acting as transcriptional activators that bind to A–T rich DNA sequences in similar positions.

In the classical model of action, LTTRs activate the transcription of a divergent gene and repress their own transcription, independently of the presence of a co-inducer or effector (small signal molecule); although there are exceptions where no co-inducer is required and in most of these cases they act as repressors (37). Therefore, the members of the family have been described as dual regulators (44). Nevertheless, there are examples where the LTTR positively autoregulates its expression; and some LTTRs can have more gene targets that they activate or repress, involved in different cellular process, different from those divergently located with respect to the gene for the regulator (39). Even more, as addressed below, LeuO is an interesting case due to the fact that it can act as derepressor, and has been shown to have complex DNA-binding sites (45, 46).

LeuO HISTORY

The first report of the LeuO regulator was by the localization of the *leuO* gene between the *leuABCD* and *ilvIH* operons; upon which it was included in the LysR family due to its amino acid sequence

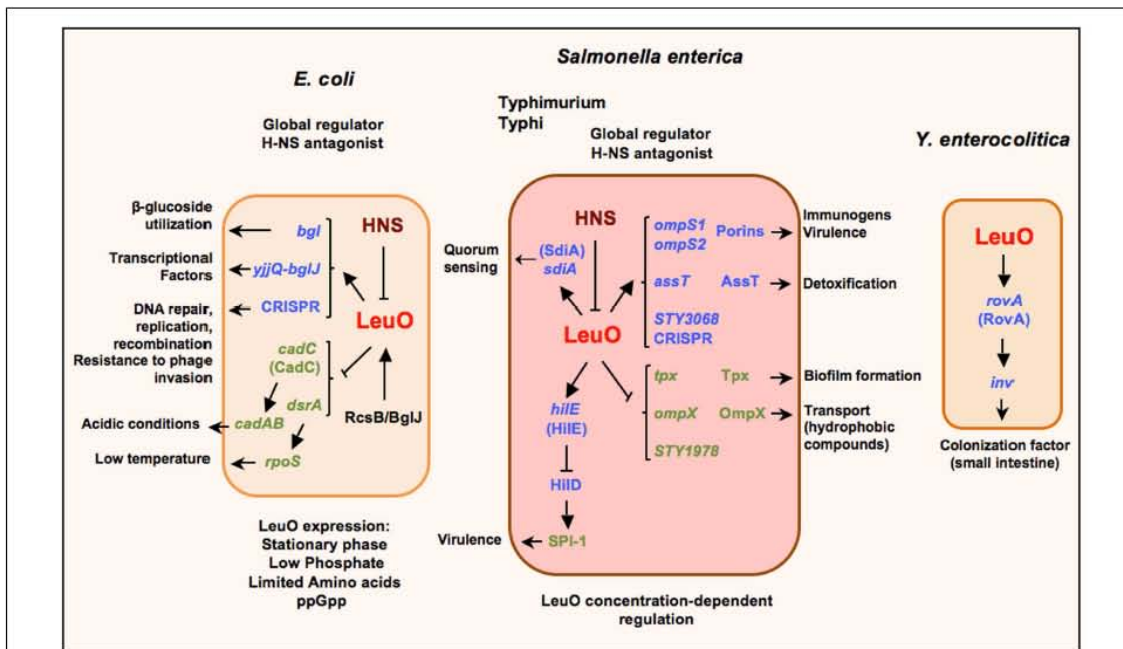


FIGURE 1 | Schematic representation of the LeuO regulon in *Escherichia coli*, *S. enterica* serovars Typhimurium and Typhi, and *Yersinia enterocolitica*. LeuO is a dual regulator that can induce the expression of several genes (arrows) and also is capable of repressing gene expression (lines). When acting as a repressor it has been suggested to function as a backup for H-NS; nevertheless in several cases LeuO acts as a derepressor of gene expression by displacement or prevention of H-NS repression. Recently,

LeuO has been denominated as a global antagonist of H-NS in *E. coli* and in *S. enterica* serovar Typhimurium. The expression of *leuO* is repressed by H-NS, although there are some stress conditions when LeuO can be detected in *E. coli*. Also, in *Salmonella* it has been described as an interesting case of differential control of transcriptional regulation, which depends on LeuO concentration. Parentheses depict the proteins coded by the indicated genes. Small arrows denote the several functions for the LeuO-regulated genes.

similitude with other members of the family (47, 48). Based on the localization of its gene, LeuO was presumed to be a *leuABCD* regulator, although Leu auxotrophy was not observed in a *leuO* mutant strain (49).

Nevertheless, since the first report of LeuO as a transcriptional regulator, it was shown to be involved in the regulation of genes important for bacterial survival in stringent conditions (Figure 1). Thereby, when LeuO was overexpressed in *E. coli* it was found to repress *cadC*: this was the result of searching for genes that can complement an H-NS mutant strain, thus providing an insight about a relationship between LeuO and H-NS (50). CadC activates the *cadAB* operon, an important system expressed under acidic conditions (51). H-NS is a global regulator that acts as a nucleoid protein (52, 53). Later, LeuO was determined to reduce *rpoS* translation (which encodes σ factor) by repression of the small regulatory DsrA-RNA, who positively regulates *rpoS* translation, mainly at low temperature (54). Both *cadC* and *dsrA* are repressed by H-NS (55, 56). Interestingly, in both cases, LeuO indirectly represses the *cadAB* operon expression and RpoS translation.

According with a LeuO-dual role regulator, it was found to be a positive regulator of *bgl* and *yjjQ-bglJ* operons in *E. coli*. Later, it was demonstrated that LeuO counteracts H-NS repression (49, 57, 58). The *bgl* operon is involved in the utilization of some β -glucosides as salicin and arbutin; and the *yjjQ-bglJ* genes encode for a transcriptional factor belonging to the LuxR family. These operons are repressed by H-NS in a wild type genotype (59) (Figure 1).

In several studies in *Salmonella* Typhimurium, a model called cis-acting promoter relay mechanism has been described that involves LeuO and DNA local supercoiling in a complex regulatory interplay, in a strain with a mutated promoter of *leuABCD* (*pleuO-500*), and a suppressor mutation in *topA* (60–62). In this complex regulatory mechanism, the Leucine-responsive regulator protein (Lrp) elicits changes in local DNA supercoiling by *ilvIH* promoter activation, exposing the *leuO* regulatory region upon which *leuO* can be transcribed (63–65). Also, there are H-NS binding sites in the regulatory region of *leuO*: hence the system appears to be repressed by changes in local supercoiling and LeuO prevents a cis-spreading of H-NS enhancing positive autoregulation and permits *leuABCD* transcription (66–69).

THE LeuO REGULATOR IN OTHER GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Studies in *S. enterica* serovar Typhi (Figure 1) have shown that overexpression of LeuO induces the expression of two quiescent genes that encode for the OmpS1 and OmpS2 porins (70, 71). An interesting observation was that the LeuO concentration differentially affects *ompS1* and *ompS2* expression. The *ompS2* gene is expressed at lower concentrations of LeuO, whereas *ompS1* is expressed at higher concentrations where *ompS2* expression is repressed. Moreover, for the first time, in a detailed study of *ompS1* expression, LeuO was shown to exert an antagonist role toward H-NS (71). The relevance of this observation is that such function had not been reported for other LTTRs members until now. Interestingly, members of other transcriptional regulators families such as VirF (AraC/XilS), RovA (SlyA/Hor), and Ler (H-NS/StpA) have

been described as antagonists of H-NS mainly on genes involved in virulence (72–74).

In a subsequent study to pursue more targets in *Salmonella* Typhi, LeuO was found to also positively regulate *assT* and STY3070; and negatively *ompX*, *tpx* and STY1978 (Figure 1). These genes are involved in a variety of cellular functions (75). AssT is a putative arylsulfate sulfotransferase that has been proposed to be involved in detoxification by transforming toxic phenolic derivatives into non-toxic compounds (76). The global regulators H-NS and LeuO regulate the *assT-dsbL-dsbl* cluster expression negatively and positively, respectively, and this regulation depends on specific growth conditions (77). STY3070 in *Salmonella* was later determined to be the *casC* gene of the CRISPR/Cas system; and its repression was found to depend also on Lrp, and its expression induced in minimal media independent of LeuO (78).

The CRISPR/Cas system in *Escherichia coli* has been involved in DNA repair, replication and recombination and is proposed to confer resistance to phage invasion in bacteria and archaea, thus the suggestion that it is an ancient defense mechanism (79). Interestingly, LeuO was shown to be an antagonist of H-NS in the CRISPR-system in *E. coli* (80). OmpX is an OMP that is homolog to PagC and Rck and Ail proteins of *Salmonella* and *Yersinia*, respectively. When overexpressed, it has been observed to increase σ E activity; and the lack of *ompX* increased the tolerance to sodium dodecyl sulfate and antibiotics, thus appearing to affect the transport of hydrophobic compounds across the membrane (81–84). Tpx is a thiol peroxidase that codes for a periplasmic antioxidant enzyme that is induced during the exponential growth phase and during biofilm formation (85). It is important to notice that LeuO down-regulates proteins that are involved in the resistance to different pH conditions (83). Another down-regulated gene was STY1978, which codes for a hypothetical protein without an association to any cellular process until now. In this report, LeuO was denominated as a global regulator and opened the possibility that LeuO could have more targets depending on the growth conditions (75).

In *Y. enterocolitica*, LeuO was found to positively regulate *rovA* and, in turn, H-NS also negatively regulates its expression (86) (Figure 1). RovA is a MarA/SlyA type regulator that regulates *inv* gene expression in response to temperature and growth phase (87).

In *E. coli*, by SELEX screening, LeuO was found to regulate genes involved in sulfa drug sensitivity and to increase its own expression during transition into stationary phase and after a week of culture, where H-NS concentration decreased (Figure 1). Even more, a global antagonistic interplay between H-NS and LeuO was proposed, acting on some genes involved in stress response, such as cryptic chaperone/usher-type fimbriae. In addition, mutants in *leuO* and in some fimbrial genes were defective or altered in biofilm formation (88, 89).

In *S. enterica* serovar Typhimurium, LeuO was reported to increase *sdiA* expression in low levels (90) (Figure 1). SdiA is proposed to respond to signals produced by other organisms (91, 92) and recently was found to be active in gut in response to AHLs (*N*-acyl homoserine lactones) a quorum sensing signal produced by other species (93–96).

In a genomic study in *S. enterica* serovar Typhimurium, using ChIP-chip, the LeuO regulon members were extended to include SPI-1 (Figure 1) and SPI-2 genes. In addition, the differential binding of LeuO and regulation of genes was observed depending on the concentration of LeuO. Another important observation was the intragenic binding; hence opening the possibility that LeuO could act as a negative regulator preventing the progress of transcription or as nucleoid structure protein. The finding of LeuO co-binding at various sites with H-NS and RNA polymerase confirms the notion of the antagonist role of LeuO, although they could likely be acting together to regulate a large number of genes. Moreover, the possible interaction with RNA polymerase and H-NS would suggest another mechanism of LeuO regulation (45, 46).

In this respect, the structural properties of LeuO as an LTTR member have been initially explored: finding that it is active as a tetramer, that the mechanisms for induction and repression of gene expression appear to be different, and that there are relevant interactions between the N- and C-termini (97).

LeuO EXPRESSION CONDITIONS

In the *Salmonella* Typhi and *E. coli* wild type genomic backgrounds, LeuO expression is silenced by H-NS (unpublished data). Nevertheless, in *E. coli* and *Salmonella* Typhimurium, *leuO* expression has been detected when grown under stress conditions, especially in the stationary phase under nutrient limitation. Nevertheless, *leuO* is not under the control of *rpoS*; although its expression requires the presence of ppGpp in stationary phase (54, 63, 98, 99). Interestingly, LeuO was shown to be essential to restore cellular growth, after a 2-h delay in a media lacking isoleucine, valine, and leucine (100).

Also, LeuO expression was detected in a phosphate-restricted media (98); and recently it was shown that the expression of the *leuO* gene can be activated by the RcsB and BglJ regulators (58, 101)

LeuO HAS SEVERAL FUNCTIONS IN VIVO

Even though LeuO is expressed at very low level in standard laboratory conditions, it seems that *in vivo* it has a role in bacterial survival. In this manner, in a mouse and in a *Caenorhabditis elegans* model of infection, a *S. enterica* serovar Typhimurium *leuO* mutant showed to be attenuated in virulence. Also, in *Vibrio cholera*, biofilm formation was reduced in a deleted *leuO* strain (102–104).

Virulence attenuation in a murine model was reported for the *ompC ompF* double mutant (105). In addition, it has been observed that the OmpC and OmpF porins induced long-term antibody response with bactericidal capacity and conferred protection against challenge with *Salmonella* Typhi (35, 36). Nevertheless, these major porins are expressed at very high levels in standard laboratory conditions. In addition, strains lacking *ompS1* and *ompS2* are attenuated for virulence, suggesting that besides lacking the LeuO regulator the absence of OmpS1 and OmpS2 porins affected bacterial survival (103). Virulence attenuation of mutated strains in *leuO* and *ompS1* and *ompS2* quiescent genes offers evidence that they are expressed *in vivo*. Even though the specific role of these porins in *Salmonella* virulence is not clear, it has been shown that the major porins are passive diffusion channels

of solutes, nutrients and toxins through the outer bacterial membrane that might allow bacteria to grow in different environments and to be resistant to drugs (106).

Recently it was found that OmpS1 and OmpS2 induced a strong immune response in the mouse, and a single dose conferred a significant protection against *Salmonella* Typhi. The immunostimulatory properties of OmpS1 and OmpS2 porins further reinforce the notion that they could be expressed following host infection. These studies are relevant because they open the possibility of using these porins as antigens for the development of vaccines against typhoid fever and other non-typhoidal salmonellosis (107).

Moreover, in a recent report it was shown that the activation of *leuO* transcription in *S. enterica* serovar Typhimurium represses expression of pathogenicity island 1 (SPI-1) and inhibits invasion of epithelial cells (108). Two different modes of action were found: the major one that involves the induction of *hilE* transcription by LeuO (Figure 1) and another one that was HilE-independent. HilE is a regulator encoded outside SPI-1 that represses *hilD* expression. HilD is one of the transcriptional factors encoded in SPI-1 that positively controls the expression of other genes in the island (109, 110). It has been suggested that LeuO repression of SPI-1 genes may occur under growth conditions where H-NS, for unknown reasons, has failed to perform such repression.

The possibility of LeuO acting as a backup for H-NS has two implications: one is that it could allow *Salmonella* to confront the hostile free-living conditions where SPI-1 gene expression has a high cost in bacterial growth; and two, it might ensure the specific, sequential, and appropriate level of SPI-1 gene expression in the intestine (111, 112). Due to the fact that H-NS in *Salmonella* is considered as a genome sentinel that silences horizontally acquired genes (113–115), LeuO could be acting as a backup regulator for H-NS, highlighting the subtleties and contrasts of the LeuO mode of action. Thus, the proposed role of LeuO as an activator or as a repressor depending on its concentration could explain this differential gene regulation.

LeuO is an example of a global regulator whose level of expression is an important issue, since this has an effect on its many regulated genes that are involved in a variety of cellular functions, such as virulence and bacterial survival. The levels of expression could thus have spatial and temporal consequences as well. In addition, knowledge of LeuO-regulated genes has been important in the study of the immune response induced by *Salmonella*, such as that elicited by the quiescent porins, which are protein components of the outer membrane. This has opened the possibility for the development of typhoid fever vaccines and perhaps as adjuvants for others vaccines.

It is intriguing that conditions known at present for LeuO expression are extreme and that in many studies it has to be over-expressed to analyze its function. Furthermore, no co-inducer of LeuO is known until now. These are some of the subjects that pose challenges for the future.

ACKNOWLEDGMENTS

Edmundo Calva was supported by grants from CONACyT, Mexico (No. 82383 and 179946).

REFERENCES

- Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol* (2007) 85(2):112–8. doi:10.1038/sj.icb.7100007
- Yue M, Schifferli DM. Allelic variation in *Salmonella*: an underappreciated driver of adaptation and virulence. *Front Microbiol* (2014) 4:419. doi:10.3389/fmicb.2013.00419
- Mittrucker HW, Kaufmann SH. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J Leukoc Biol* (2000) 67(4):457–63.
- Chen HM, Wang Y, Su LH, Chiu CH. Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatr Neonatol* (2013) 54(3):147–52. doi:10.1016/j.pedneo.2013.01.010
- de Jong HK, Parry CM, van der Poll T, Wiersinga WJ. Host-pathogen interaction in invasive salmonellosis. *PLoS Pathog* (2012) 8(10):e1002933. doi:10.1371/journal.ppat.1002933
- Galan JE. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2001) 17:53–86. doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.53
- Waterman SR, Holden DW. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* (2003) 5(8):501–11. doi:10.1046/j.1462-5822.2003.00294.x
- Hannemann S, Gao B, Galán JE. *Salmonella* modulation of host cell gene expression promotes its intracellular growth. *PLoS Pathog* (2013) 9(10):e1003668. doi:10.1371/journal.ppat.1003668
- Patel JC, Galán JE. Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol* (2006) 175(3):453–63. doi:10.1083/jcb.200605144
- Patel JC, Galán JE. Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella* – all in the name of entry. *Curr Opin Microbiol* (2005) 8(1):10–5. doi:10.1016/j.mib.2004.09.001
- Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, Galán JE. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* (1997) 159(11):5550–9.
- Bruno VM, Hamemann S, Lara-Tejero M, Flavell RA, Kleinstein SH, Galán JE. *Salmonella typhimurium* type III secretion effectors stimulate innate immune responses in cultured epithelial cells. *PLoS Pathog* (2009) 5(8):e1000538. doi:10.1371/journal.ppat.1000538
- Behnsen J, Jellbauer S, Wong CP, Edwards RA, George MD, Ouyang W, et al. The cytokine IL-22 promotes pathogen colonization by suppressing related commensal bacteria. *Immunity* (2014) 40(2):262–73. doi:10.1016/j.immuni.2014.01.003
- Jenner RG, Young RA. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat Rev Microbiol* (2005) 3(4):281–94. doi:10.1038/nrmicro1126
- Lee J, Mo JH, Shen C, Rucker AN, Raz E. Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells contributes to colonic homeostasis. *Curr Opin Gastroenterol* (2007) 23(1):27–31. doi:10.1097/MOG.0b013e3280118272
- Shibolet O, Podolsky DK. TLRs in the Gut. IV. Negative regulation of toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2007) 292(6):G1469–73. doi:10.1152/ajpgi.00531.2006
- Lang T, Mansell A. The negative regulation of toll-like receptor and associated pathways. *Immunol Cell Biol* (2007) 85(6):425–34. doi:10.1038/sj.icb.7100094
- Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cell Microbiol* (2007) 9(11):2562–70. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01036.x
- Lindgren SW, Stojiljkovic I, Heffron F. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) 93(9):4197–201. doi:10.1073/pnas.93.9.4197
- Wijburg OL, Simmons CP, van Rooijen N, Strugnell RA. Dual role for macrophages in vivo in pathogenesis and control of murine *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infections. *Eur J Immunol* (2000) 30(3):944–53. doi:10.1002/1521-4141(200003)30:3<944::AID-IMMU944>3.3.CO;2-T
- Monack DM, Bouley DM, Falkow S. *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nrpmp1+/+ mice and can be reactivated by IFN γ neutralization. *J Exp Med* (2004) 199(2):231–41. doi:10.1084/jem.20031319
- McSorley SJ. Immunity to intestinal pathogens: lessons learned from *Salmonella*. *Immunol Rev* (2014) 260(1):168–82. doi:10.1111/imr.12184
- Mittrucker HW, Kohler A, Kaufmann SH. Characterization of the murine T-lymphocyte response to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* (2002) 70(1):199–203. doi:10.1128/IAI.70.1.199-203.2002
- Srinivasan A, Foley J, McSorley SJ. Massive number of antigen-specific CD4 T cells during vaccination with live attenuated *Salmonella* causes interclonal competition. *J Immunol* (2004) 172(11):6884–93. doi:10.4049/jimmunol.172.11.6884
- Nauciel C. Role of CD4+ T cells and T-independent mechanisms in acquired resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *J Immunol* (1990) 145(4):1265–9.
- Mastroeni P, Villarreal-Ramos B, Hormaeche CE. Role of T cells, TNF alpha and IFN gamma in recall of immunity to oral challenge with virulent *Salmonellae* in mice vaccinated with live attenuated aro-*Salmonella* vaccines. *Microb Pathog* (1992) 13(6):477–91. doi:10.1016/0882-4010(92)90014-F
- O'Donnell H, Pham OH, Li LX, Atif SM, Lee SJ, Ravesloot MM, et al. Toll-like receptor and inflammasome signals converge to amplify the innate bactericidal capacity of T helper 1 cells. *Immunity* (2014) 40(2):213–24. doi:10.1016/j.immuni.2013.12.013
- Mastroeni P, Villarreal-Ramos B, Hormaeche CE. Adoptive transfer of immunity to oral challenge with virulent *Salmonellae* in innately susceptible BALB/c mice requires both immune serum and T cells. *Infect Immun* (1993) 61(9):3981–4.
- Cookson BT, Bevan MJ. Identification of a natural T-cell epitope presented by *Salmonella*-infected macrophages and recognized by T cells from orally immunized mice. *J Immunol* (1997) 158(9):4310–9.
- Bergman MA, Cummings LA, Alaniz RC, Mayeda L, Fellnerova I, Cookson BT. CD4+ T-cell responses generated during murine *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection are directed towards multiple epitopes within the natural antigen FliC. *Infect Immun* (2005) 73(11):7226–35. doi:10.1128/IAI.73.11.7226-7235.2005
- Salazar-Gonzalez RM, McSorley SJ. *Salmonella* flagellin, a microbial target of the innate and adaptive immune system. *Immunol Lett* (2005) 101(2):117–22. doi:10.1016/j.imlet.2005.05.004
- McSorley SJ, Cookson BT, Jenkins MK. Characterization of CD4+ T cell responses during natural infection with *Salmonella typhimurium*. *J Immunol* (2000) 164(2):986–93. doi:10.4049/jimmunol.164.2.986
- Strindelius L, Degling Wikingsson L, Sjöholm I. Extracellular antigens from *Salmonella enteritidis* induce effective immune response in mice after oral vaccination. *Infect Immun* (2002) 70(3):1434–42. doi:10.1128/IAI.70.3.1434-1442.2002
- Blanco F, Isibasi A, Raul Gonzalez C, Ortiz V, Paniagua J, Arreguin C, et al. Human cell mediated immunity to porins from *Salmonella typhi*. *Scand J Infect Dis* (1993) 25(1):73–80. doi:10.1080/00365549309169673
- Isibasi A, Ortiz-Navarrete V, Paniagua J, Pelayo R, Gonzalez CR, García JA, et al. Active protection of mice against *Salmonella typhi* by immunization with strain-specific porins. *Vaccine* (1992) 10(12):811–3. doi:10.1016/0264-410X(92)90041-H
- Secundino I, López-Macias C, Cervantes-Barragán L, Gil-Cruz C, Ríos-Sarabia N, Pastelin-Palacios R, et al. *Salmonella* porins induce a sustained, lifelong specific bactericidal antibody memory response. *Immunology* (2006) 117(1):59–70. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02263.x
- Schell MA. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* (1993) 47:597–626. doi:10.1146/annurev.mi.47.100193.003121
- Tropel D, van der Meer JR. Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol Mol Biol Rev* (2004) 68(3):474–500. doi:10.1128/MMBR.68.3.474-500.2004
- Maddocks SE, Oyston PC. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* (2008) 154(Pt 12):3609–23. doi:10.1099/mic.0.2008/022772-0
- Pareja E, Pareja-Tobes P, Manrique M, Pareja-Tobes E, Bonal J, Tobes R. Extratrain: a database of extragenic regions and transcriptional information in prokaryotic organisms. *BMC Microbiol* (2006) 6:29. doi:10.1186/1471-2180-6-29
- Muraoka S, Okumura R, Ogawa N, Nonaka T, Miyashita K, Senda T. Crystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J Mol Biol* (2003) 328(3):555–66. doi:10.1016/S0022-2836(03)00312-7

42. Sainsbury S, Lane LA, Ren J, Gilbert RJ, Saunders NJ, Robinson CV, et al. The structure of CrgA from *Neisseria meningitidis* reveals a new octameric assembly state for LysR transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res* (2009) 37(14):4545–58. doi:10.1093/nar/gkp445
43. Zhou X, Lou Z, Fu S, Yang A, Shen H, Li Z, et al. Crystal structure of ArgP from *Mycobacterium tuberculosis* confirms two distinct conformations of full-length LysR transcriptional regulators and reveals its function in DNA binding and transcriptional regulation. *J Mol Biol* (2010) 396(4):1012–24. doi:10.1016/j.jmb.2009.12.033
44. Perez-Rueda E, Collado-Vides J. The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* (2000) 28(8):1838–47. doi:10.1093/nar/28.8.1838
45. Dillon SC, Espinosa E, Hokamp K, Ussery DW, Casades J, Dorman CJ. LeuO is a global regulator of gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* (2012) 85(6):1072–89. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08162.x
46. Hernández-Lucas I, Calva E. The coming of age of the LeuO regulator. *Mol Microbiol* (2012) 85(6):1026–8. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08175.x
47. Hertzberg KM, Gemmill R, Jones J, Calvo JM. Cloning of an *EcoRI*-generated fragment of the leucine operon of *Salmonella typhimurium*. *Gene* (1980) 8(2):135–52. doi:10.1016/0378-1119(80)90033-5
48. Henikoff S, Haughn GW, Calvo JM, Wallace JC. A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1988) 85(18):6602–6. doi:10.1073/pnas.85.18.6602
49. Ueguchi C, Ohta T, Seto C, Suzuki T, Mizuno T. The LeuO gene product has a latent ability to relieve *bgl* silencing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* (1998) 180(1):190–3.
50. Shi X, Bennett GN. Effects of multicopy LeuO on the expression of the acid-inducible lysine decarboxylase gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* (1995) 177(3):810–4.
51. Sokawatmaekhin W, Kuraishi A, Sakata K, Kashiwagi K, Igarashi K. Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* (2004) 51(5):1401–12. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03913.x
52. Rimsky S, Spassky A. Sequence determinants for H1 binding on *Escherichia coli lac* and *gal* promoters. *Biochemistry* (1990) 29(15):3765–71. doi:10.1021/bi00467a024
53. Durrenberger M, La Teana A, Citro G, Venanzi F, Gualerzi CO, Pon CL. *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS is localized in the nucleoid. *Res Microbiol* (1991) 142(4):373–80. doi:10.1016/0923-2508(91)90106-K
54. Klauk E, Bohringer J, Hengge-Aronis R. The LysR-like regulator LeuO in *Escherichia coli* is involved in the translational regulation of *rpoS* by affecting the expression of the small regulatory DsrA-RNA. *Mol Microbiol* (1997) 25(3):559–69. doi:10.1046/j.1365-2958.1997.4911852.x
55. Shi X, Waasdorp BC, Bennett GN. Modulation of acid-induced amino acid decarboxylase gene expression by HNS in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* (1993) 175(4):1182–6.
56. Yamashino T, Ueguchi C, Mizuno T. Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, sigma S, in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H-NS. *EMBO J* (1995) 14(3):594–602.
57. Bartowsky E, Normark S. Purification and mutant analysis of *Citrobacter freundii* AmpR, the regulator for chromosomal AmpC beta-lactamase. *Mol Microbiol* (1991) 5(7):1715–25. doi:10.1111/j.1365-2958.1991.tb01920.x
58. Stratmann T, Madhusudan S, Schnetz K. Regulation of the *yjiQ-bglJ* operon, encoding LuxR-type transcription factors, and the divergent *yjiP* gene by H-NS and LeuO. *J Bacteriol* (2008) 190(3):926–35. doi:10.1128/JB.01447-07
59. Bertin P, Lejeune P, Laurent-Winter C, Danchin A. Mutations in *bglY*, the structural gene for the DNA-binding protein H1, affect expression of several *Escherichia coli* genes. *Biochimie* (1990) 72(12):889–91. doi:10.1016/0300-9084(90)90008-5
60. Lilley DM, Higgins CE. Local DNA topology and gene expression: the case of the *leu-500* promoter. *Mol Microbiol* (1991) 5(4):779–83. doi:10.1111/j.1365-2958.1991.tb00749.x
61. Chen D, Bowater R, Dorman CJ, Lilley DM. Activity of a plasmid-borne *leu-500* promoter depends on the transcription and translation of an adjacent gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992) 89(18):8784–8. doi:10.1073/pnas.89.18.8784
62. Wu HY, Tan J, Fang M. Long-range interaction between two promoters: activation of the *leu-500* promoter by a distant upstream promoter. *Cell* (1995) 82(3):445–51. doi:10.1016/0092-8674(95)90433-6
63. Fang M, Wu HY. Suppression of *leu-500* mutation in *topA+* *Salmonella typhimurium* strains. The promoter relay at work. *J Biol Chem* (1998) 273(45):29929–34. doi:10.1074/jbc.273.45.29929
64. Fang M, Wu HY. A promoter relay mechanism for sequential gene activation. *J Bacteriol* (1998) 180(3):626–33.
65. Wu HY, Fang M. DNA supercoiling and transcription control: a model from the study of suppression of the *leu-500* mutation in *Salmonella typhimurium topA+*-strains. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* (2003) 73:43–68. doi:10.1016/S0079-6603(03)01002-X
66. Chen CC, Fang M, Majumder A, Wu HY. A 72-base pair AT-rich DNA sequence element functions as a bacterial gene silencer. *J Biol Chem* (2001) 276(12):9478–85. doi:10.1074/jbc.M010501200
67. Chen CC, Ghole M, Majumder A, Wang Z, Chandana S, Wu HY. LeuO-mediated transcriptional derepression. *J Biol Chem* (2003) 278(39):38094–103. doi:10.1074/jbc.M300461200
68. Chen CC, Wu HY. LeuO protein delimits the transcriptionally active and repressive domains on the bacterial chromosome. *J Biol Chem* (2005) 280(15):15111–21. doi:10.1074/jbc.M414544200
69. Chen CC, Chou MY, Huang CH, Majumder A, Wu HY. A cis-spreading nucleoprotein filament is responsible for the gene silencing activity found in the promoter relay mechanism. *J Biol Chem* (2005) 280(6):5101–12. doi:10.1074/jbc.M411840200 Epub 2004/12/08. .
70. Fernández-Mora M, Puente JL, Calva E. OmpR and LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* serovar Typhi *ompS2* porin gene. *J Bacteriol* (2004) 186(10):2909–20. doi:10.1128/JB.186.10.2909-2920.2004
71. De la Cruz MA, Fernández-Mora M, Guadarrama C, Flores-Valdez MA, Bustamante VH, Vázquez A, et al. LeuO antagonizes H-NS and StpA-dependent repression in *Salmonella enterica* *ompS1*. *Mol Microbiol* (2007) 66(3):727–43. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05958.x
72. Tobe T, Yoshikawa M, Mizuno T, Sasakawa C. Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* of *Shigella flexneri*: activation by VirF and repression by H-NS. *J Bacteriol* (1993) 175(19):6142–9.
73. Bustamante VH, Santana FJ, Calva E, Puente JL. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* (2001) 39(3):664–78. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02209.x
74. Heroven AK, Nagel G, Tran HJ, Parr S, Dersch P, RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of *invasin* and *rovA* expression in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* (2004) 53(3):871–88. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04162.x
75. Hernández-Lucas I, Gallego-Hernández AL, Encarnación S, Fernández-Mora M, Martínez-Batallar AG, Salgado H, et al. The LysR-type transcriptional regulator LeuO controls expression of several genes in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Bacteriol* (2008) 190(5):1658–70. doi:10.1128/JB.01649-07
76. Kang JW, Kwon AR, Kim DH, Choi EC. Cloning and sequencing of the *astA* gene encoding arylsulfate sulfotransferase from *Salmonella typhimurium*. *Biol Pharm Bull* (2001) 24(5):570–4. doi:10.1248/bpb.24.570
77. Gallego-Hernández AL, Hernández-Lucas I, De la Cruz MA, Olvera L, Morett E, Medina-Aparicio L, et al. Transcriptional regulation of the *astT-āslL-āslI* gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Typhi IMSS-1 depends on LeuO, H-NS, and specific growth conditions. *J Bacteriol* (2012) 194(9):2254–64. doi:10.1128/JB.06164-11
78. Medina-Aparicio L, Rebollos-Flores JE, Gallego-Hernández AL, Vázquez A, Olvera L, Gutiérrez-Rios RM, et al. The CRISPR/Cas immune system is an operon regulated by LeuO, H-NS, and leucine-responsive regulatory protein in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Bacteriol* (2011) 193(10):2396–407. doi:10.1128/JB.01480-10
79. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* (2007) 315(5819):1709–12. doi:10.1126/science.1138140
80. Westra ER, Pul U, Heidrich N, Jore MM, Lundgren M, Stratmann T, et al. H-NS-mediated repression of CRISPR-based immunity in *Escherichia coli* K12 can be relieved by the transcription activator LeuO. *Mol Microbiol* (2010) 77(6):1380–93. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07315.x

81. Mecsas J, Rouviere PE, Erickson JW, Donohue TJ, Gross CA. The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev* (1993) 7(12B):2618–28. doi:10.1101/gad.7.12b.2618
82. Mecsas J, Welch R, Erickson JW, Gross CA. Identification and characterization of an outer membrane protein, OmpX, in *Escherichia coli* that is homologous to a family of outer membrane proteins including Ail of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* (1995) 177(3):799–804.
83. Stancik LM, Stancik DM, Schmidt B, Barnhart DM, Yoncheva YN, Slonczewski JL. pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* (2002) 184(15):4246–58. doi:10.1128/JB.184.15.4246-4258.2002
84. Otto K, Hermansson M. Inactivation of *ompX* causes increased interactions of type 1 fimbriated *Escherichia coli* with abiotic surfaces. *J Bacteriol* (2004) 186(1):226–34. doi:10.1128/JB.186.1.226-234.2004
85. Kim YH, Lee Y, Kim S, Yeom J, Yeom S, Seok Kim B, et al. The role of periplasmic antioxidant enzymes (superoxide dismutase and thiol peroxidase) of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the formation of biofilms. *Proteomics* (2006) 6(23):6181–93. doi:10.1002/pmic.200600320
86. Lawrenz MB, Miller VL. Comparative analysis of the regulation of *rovA* from the pathogenic yersiniae. *J Bacteriol* (2007) 189(16):5963–75. doi:10.1128/JB.00528-07
87. Revell PA, Miller VL. A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence. *Mol Microbiol* (2000) 35(3):677–85. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01740.x
88. Shimada T, Yamamoto K, Ishihama A. Involvement of the leucine response transcription factor LeuO in regulation of the genes for sulfa drug efflux. *J Bacteriol* (2009) 191(14):4562–71. doi:10.1128/JB.00108-09
89. Shimada T, Bridier A, Briandet R, Ishihama A. Novel roles of LeuO in transcription regulation of *E. coli* genome: antagonistic interplay with the universal silencer H-NS. *Mol Microbiol* (2011) 82(2):378–97. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07818.x
90. Turnbull AL, Kim W, Surette MG. Transcriptional regulation of *sdiA* by cAMP-receptor protein, LeuO, and environmental signals in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Can J Microbiol* (2012) 58(1):10–22. doi:10.1139/W11-101
91. Michael B, Smith JN, Swift S, Heffron F, Ahmer BM. SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol* (2001) 183(19):5733–42. doi:10.1128/JB.183.19.5733-5742.2001
92. Smith JN, Ahmer BM. Detection of other microbial species by *Salmonella*: expression of the SdiA regulon. *J Bacteriol* (2003) 185(4):1357–66. doi:10.1128/JB.185.4.1357-1366.2003
93. Ahmer BM, Smith JN, Dyszel JL, Lindsay A. Methods in cell-to-cell signaling in *Salmonella*. *Methods Mol Biol* (2007) 394:307–22. doi:10.1007/978-1-59745-512-1_15
94. Gorshkov V, Petrova O, Gogoleva N, Gogolev Y. Cell-to-cell communication in the populations of enterobacterium *Erwinia carotovora* ssp. atroseptica SCRI1043 during adaptation to stress conditions. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2010) 59(3):378–85. doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00684.x
95. Mei GY, Yan XX, Turak A, Luo ZQ, Zhang LQ. AidH, an alpha/beta-hydrolyase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel N-acylhomoserine lactonase. *Appl Environ Microbiol* (2010) 76(15):4933–42. doi:10.1128/AEM.00477-10
96. Weeks JN, Galindo CL, Drake KL, Adams GL, Garner HR, Ficht TA. *Brucella melitensis* VjbR and C12-HSL regulons: contributions of the N-dodecanoyl homoserine lactone signaling molecule and LuxR homologue VjbR to gene expression. *BMC Microbiol* (2010) 10:167. doi:10.1186/1471-2180-10-167
97. Guadarrama C, Medrano-López A, Oropeza R, Hernández-Lucas I, Calva E. The *Salmonella enterica* Serovar Typhi LeuO global regulator forms tetramers: residues involved in oligomerization, DNA binding and transcriptional regulation. *J Bacteriol* (2014) 196(12):2143–54. doi:10.1128/JB.01484-14
98. VanBogelen RA, Olson ER, Wanner BL, Neidhardt FC. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* (1996) 178(15):4344–66.
99. Fang M, Majumder A, Tsai KJ, Wu HY. ppGpp-dependent *leuO* expression in bacteria under stress. *Biochem Biophys Res Commun* (2000) 276(1):64–70. doi:10.1006/bbrc.2000.3440
100. Majumder A, Fang M, Tsai KJ, Ueguchi C, Mizuno T, Wu HY. LeuO expression in response to starvation for branched-chain amino acids. *J Biol Chem* (2001) 276(22):19046–51. doi:10.1074/jbc.M100945200
101. Stratmann T, Pul U, Wurm R, Wagner R, Schnetz K. RcsB-BglJ activates the *Escherichia coli leuO* gene, encoding an H-NS antagonist and pleiotropic regulator of virulence determinants. *Mol Microbiol* (2012) 83(6):1109–23. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.07993.x
102. Lawley TD, Chan K, Thompson LJ, Kim CC, Govoni GR, Monack DM. Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* (2006) 2(2):e11. doi:10.1371/journal.ppat.0020011
103. Rodríguez-Morales O, Fernández-Mora M, Hernández-Lucas I, Vázquez A, Puente JL, Calva E. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *ompS1* and *ompS2* mutants are attenuated for virulence in mice. *Infect Immun* (2006) 74(2):1398–402. doi:10.1128/IAI.74.2.1398-1402.2006
104. Moorthy S, Watnick PI. Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Mol Microbiol* (2005) 57(6):1623–35. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04797.x
105. Chatfield SN, Dorman CJ, Hayward C, Dougan G. Role of OmpR-dependent genes in *Salmonella typhimurium* virulence: mutants deficient in both *ompC* and *ompF* are attenuated *in vivo*. *Infect Immun* (1991) 59(1):449–52.
106. Gil E, Ipizna F, Fuentes J, Fumeron R, Villarreal JM, Aspee A, et al. The *ompW* (porin) gene mediates methyl viologen (paraquat) efflux in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Res Microbiol* (2007) 158(6):529–36. doi:10.1016/j.resmic.2007.05.004
107. Moreno-Eutimio MA, Tenorio-Calvo A, Pastelin-Palacios R, Pérez-Shibayama C, Gil-Cruz C, López-Santiago R, et al. *Salmonella* Typhi OmpS1 and OmpS2 porins are potent protective immunogens with adjuvant properties. *Immunology* (2013) 139(4):459–71. doi:10.1111/imm.12093
108. Espinosa E, Casadestis J. Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 (SPI-1) by the LysR-type regulator LeuO. *Mol Microbiol* (2014) 91(6):1057–69. doi:10.1111/mmi.12500
109. Fahlen TF, Mathur N, Jones BD. Identification and characterization of mutants with increased expression of *hilA*, the invasion gene transcriptional activator of *Salmonella typhimurium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2000) 28(1):25–35. doi:10.1111/j.1574-695X.2000.tb01453.x
110. Lostroh CP, Lee CA. The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect* (2001) 3(14–15):1281–91. doi:10.1016/S1286-4579(01)01488-5
111. Sturm A, Heinemann M, Arnoldini M, Benecke A, Ackermann M, Benz M, et al. The cost of virulence: retarded growth of *Salmonella typhimurium* cells expressing type III secretion system 1. *PLoS Pathog* (2011) 7(7):e1002143. doi:10.1371/journal.ppat.1002143
112. Bustamante VH, Calva E. LeuO, a dormant sentinel for SPI-1? *Mol Microbiol* (2014) 91(6):1054–6. doi:10.1111/mmi.12514
113. Lucchini S, Rowley G, Goldberg MD, Hurd D, Harrison M, Hinton JC. H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog* (2006) 2(8):e81. doi:10.1371/journal.ppat.0020081
114. Navarre WW, Porwollik S, Wang Y, McClelland M, Rosen H, Libby SJ, et al. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* (2006) 313(5784):236–8. doi:10.1126/science.1128794
115. Dorman CJ. H-NS, the genome sentinel. *Nat Rev Microbiol* (2007) 5(2):157–61. doi:10.1038/nrmicro1598

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 17 July 2014; accepted: 30 October 2014; published online: 12 December 2014.
Citation: Guadarrama C, Villaseñor T and Calva E (2014) The subtleties and contrasts of the LeuO regulator in *Salmonella Typhi*: implications in the immune response. *Front. Immunol.* 5:581. doi: 10.3389/fimmu.2014.00581
This article was submitted to *Microbial Immunology*, a section of the journal *Frontiers in Immunology*.
Copyright © 2014 Guadarrama, Villaseñor and Calva. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.