

00591

12ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

ESTUDIOS SOBRE LA EXPRESION Y FUNCION DE BfpT, EL
REGULADOR POSITIVO DE LA EXPRESION DEL GENE *bfpA* DE
Escherichia coli ENTEROPATOGENA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

PRESENTA:

YGNACIO MARTINEZ LAGUNA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUERNAVACA, MOR.

2000

NOVIEMBRE



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 trabajo se realizó en el laboratorio de los Doctores José Luis Puente García y Edmundo Calva Mercado, del Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor., México.

Este trabajo fue asesorado por el siguiente Comité Tutorial:

Dr. José Luis Puente García

Dra. Susana López Charretón

Dr. Juan Enrique Morett Sánchez

Dr. Edmundo Calva Mercado

Durante el desarrollo del trabajo el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (no. 93833), del Programa de Apoyo al Posgrado de la UNAM (nos. 030531 y 202347), del Programa del Mejoramiento del Profesorado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (PROMEP/BUAP- 242) y de los proyectos UNAM (DGAPA IN-208095) y CONACyT (1027P-N)

INDICE

	PAGINA
I.- RESUMEN/ ABSTRACT	1
II.- INTRODUCCION	5
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena	5
Regulación de los factores de virulencia en EPEC	12
Justificación	15
III.- OBJETIVOS	16
IV.- MATERIALES Y METODOS	17
Cepas bacterianas	17
Condiciones de crecimiento	18
Construcciones genéticas y análisis de la secuencia de DNA	19
Fusiones transcripcionales <i>bfpT-cat</i> .	20
Ensayo de actividad para CAT	21
Aislamiento de RNA y análisis por ensayos de extensión inversa ("primer extension")	22
Ensayos de hibridación tipo "slot blot"	23
V.- RESULTADOS	24
Identificación de secuencias requeridas para la expresión de <i>bfpT</i> , usando fusiones transcripcionales <i>bfpT-cat</i> .	24
Localización del sitio de inicio de la transcripción de <i>bfpT</i> .	24
Autorregulación positiva de <i>bfpT</i> .	29
Las regiones reguladoras de <i>bfpT</i> y <i>bfpA</i> comparten homología en una secuencia que es indispensable para la activación dependiente de BfpT.	31
La expresión de <i>bfpT</i> ocurre a través de toda la curva de crecimiento	31

<i>bfpA</i> y <i>bfpT</i> son regulados de manera similar por el medio de cultivo, la concentración de amonio y la temperatura	33
La regulación por amonio de <i>bfpA</i> y <i>bfpT</i> requiere de un factor específico de EPEC, mientras que la regulación por bajas temperaturas involucra un mecanismo global	41
Efecto de otros factores ambientales sobre la expresión de <i>bfpA</i> y <i>bfpT</i>	43
VI.- DISCUSION	46
VII.- CONCLUSIONES	58
VIII. PERSPECTIVAS	60
VIII.- BIBLIOGRAFIA	61
IX.- ANEXO	70

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas		PAGINA
I.-	TABLA 1 Clases principales de <i>Escherichia coli</i> diarreogénica.	6
II.-	TABLA 2 Reguladores transcripcionales de la Familia AraC involucrados en la expresión de factores de virulencia en bacterias enteropatógenas.	14
III.-	TABLA 3 Regulación de <i>bfpT</i> y <i>bfpA</i> en respuesta a Osmolaridad, pH y Fierro.	45
 Figuras		
IV.-	FIGURA 1 Interacciones de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena con las células del Hospedero.	9
V.-	FIGURA 2 Genes de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena involucrados en la interacción con células hospederas.	10
VI.-	FIGURA 3 Actividad de las fusiones transcripcionales <i>bfpT-cat</i> .	25
VII.-	FIGURA 4 Análisis del promotor de <i>bfpT</i> .	27
VIII.-	FIGURA 5 Secuencia nucleotídica de la región reguladora de <i>bfpT</i> .	28
IX.-	FIGURA 6 Expresión de <i>bfpT</i> requiere de la presencia de una proteína BfpT funcional.	30
X.-	FIGURA 7 Homología entre las regiones reguladoras mínimas de <i>bfpA</i> y <i>bfpT</i> .	32

XI.-	FIGURA 8	
	La expresión de <i>bfpT</i> en EPEC B171-8 ocurre durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria temprana.	34
XII.-	FIGURA 9	
	Efecto de la fase de crecimiento sobre la transcripción de <i>bfpT</i> y <i>bfpA</i> en EPEC B171-8.	35
XIII	FIGURA 10	
	La expresión de <i>bfpT</i> en EPEC B171-8 es afectada por el crecimiento en medio LB.	37
XIV.-	FIGURA 11	
	Efecto del amonio y la temperatura sobre la expresión de <i>bfpT</i> y <i>bfpA</i> .	38
XV.-	FIGURA 12	
	Efecto del medio de cultivo, la temperatura y la concentración de amonio sobre la transcripción de <i>bfpT</i> .	40
XVI.-	FIGURA 13	
	La regulación de <i>bfpT</i> y <i>bfpA</i> por amonio, pero no por temperatura, requiere de un fondo de EPEC.	42
XVII.-	FIGURA 14	
	Representación esquemática de la red reguladora en la expresión de los factores de virulencia de EPEC.	56
XVIII.-	FIGURA 15	
	Modelo de regulación de la expresión de fimbrias de bacterias enteropatógenas por factores ambientales en el intestino.	57

RESUMEN

El fenotipo de adherencia localizada mostrado por *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) está relacionado a la producción de la fimbria BFP (“Bundle-Forming Pilus”). La subunidad estructural de BFP está codificado por el gen *bfpA*, cuya expresión requiere del producto de *bfpT* (también llamado *perA*). BfpT pertenece a la familia AraC de reguladores transcripcionales. *bfpA* es selectivamente expresado durante la fase exponencial de crecimiento. Dicha expresión se modula por la concentración de amonio, el crecimiento en medio LB y por la temperatura.

En el presente trabajo describimos la regulación transcripcional de la expresión de *bfpT*. Hemos encontrado que *bfpT* es transcrito a partir de un promotor convencional sigma-70 y es expresado durante toda la curva de crecimiento. Experimentos con fusiones transcripcionales *bfpT-cat* y ensayos tipo “primer extension”, mostraron que la expresión de *bfpT* se modula por la concentración de amonio, el crecimiento en medio LB y la temperatura en las mismas proporciones que aquellas previamente descritas para *bfpA*. Además, tanto la expresión de *bfpA* y *bfpT* parece ser modulada por la osmolaridad, sin embargo no son afectadas por el pH ni la concentración de Hierro, sugiriendo que la respuesta de la expresión de *bfpA* a las señales ambientales es mediada, por lo menos en parte, por los niveles celulares de BfpT. Por otra parte, las fusiones *bfpT-cat* no se expresaron en cepas no EPEC o mutantes en *bfpT* a menos que estuviera presente un gen funcional de *bfpT*, indicando que en su expresión está involucrado un mecanismo de autorregulación positiva.

Interesantemente, la represión por amonio sólo fue observada cuando la expresión de *bfpT-cat* o *bfpA-cat* fue complementada en un fondo genético de EPEC; mientras que la regulación por bajas temperaturas fue observada tanto en la cepa EPEC como en la no EPEC. Esto sugiere que hay elementos reguladores específicos en EPEC, mientras que otros también están presentes en las cepas no patógenas de *E. coli*.

El análisis por remoción de fragmentos de la región corriente arriba de *bfpT*, reveló que un segmento de DNA de 81 bp, a partir del sitio de inicio de la transcripción, fue la secuencia mínima requerida para la expresión máxima de *bfpT*.

Esta región comparte una homología considerable con una región rica en A-T, localizada “corriente arriba” del promotor de *bfpA*, la cual contiene secuencias repetidas invertidas y directas, y ha sido involucrada en la regulación de *bfpA* dependiente de BfpT. De esta manera, la expresión de *bfpA* y *bfpT* parece ser regulada por una red compleja de interacciones en respuesta a señales ambientales que pudieran determinar la adherencia bacteriana a la superficie de las células hospederas.

ABSTRACT

The localized adherence phenotype shown by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), is related to the production of the bundle-forming pilus (BFP). The structural subunit of BFP is encoded by the *bfpA* gene, whose expression requires the product of *bfpT* (also called *perA*). BfpT is a member of the AraC family of transcriptional regulators. *bfpA* is selectively expressed during the exponential phase of growth. Such expression is modulated by ammonium concentration, by growth in LB media and temperature.

In this work, we described the transcriptional regulation of the expression of *bfpT*. We found that *bfpT* is transcribed from a conventional sigma-70 promoter and that it is expressed throughout the growth curve. Experiments with *bfpT-cat* transcriptional fusions and primer extension analysis, showed that *bfpT* expression is modulated by the ammonium concentration, growth in LB media, and temperature, in the same proportions as those previously described for *bfpA*. In addition, *bfpT* and *bfpA* expression appears to be modulated by osmolarity, however was not affected by pH nor by iron concentration, suggesting that the response of *bfpA* expression to environmental signals is mediated, at least in part, by the cellular levels of BfpT. Furthermore, the *bfpT-cat* fusions were not expressed in a non-EPEC strain nor in a *bfpT*-minus EPEC, unless a functional *bfpT* gene was present, indicating than a positive autoregulatory mechanism is involved in its expression.

Interestingly, ammonium repression was observed only when *bfpT-cat* or *bfpA-cat* expression was complemented in an EPEC background; whereas low-temperature regulation was observed in both EPEC and non-EPEC strains. This suggests that specific regulatory elements are present in EPEC, while others are present in non-pathogenic *E. coli* strains.

Deletion analysis of the *bfpT* upstream region, revealed that a DNA segment of 81 bp, extending upstream from the transcriptional start site, was the minimal sequence required for maximal expression of *bfpT*. This region shares significant homology with an AT-rich region localized upstream of the *bfpA* promoter, which contains direct and inverted

repeats, that has been shown to be involved in the BfpT-dependent regulation of *bfpA*. Thus, *bfpT* and *bfpA* expression appears to be regulated by a complex network of interactions in response to environmental signals that could determine the bacterial adherence to the host cell surfaces.

INTRODUCCION

Las cepas diarreogénicas de *Escherichia coli* asociadas a enfermedades gastrointestinales, son clasificadas mediante un esquema basado en los mecanismos de virulencia utilizados para interactuar con las células hospederas y causar la enfermedad. Las características que forman las bases para este sistema incluyen: patrones de adherencia bacteriana a las células hospederas, efecto de la adherencia sobre la célula hospedera, producción de toxinas, e invasividad. De esta forma se proponen seis clases principales de *E. coli* diarreogénica: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), y *E. coli* difusoadherente (DAEC) (Tabla 1) (Levine, 1987, Kaper, 1994; Salyers y Whitt, 1994; Nataro y Kaper, 1998).

***Escherichia coli* enteropatógena.**

En países en desarrollo las cepas de EPEC son una de las mayores causas de diarrea infantil endémica. Durante brotes estacionales, EPEC es el enteropatógeno bacteriano más común entre infantes menores de 6 meses de edad (Levine y Edelman, 1984; Kaper, 1994).

Cuando EPEC se adhiere a tejido intestinal humano produce una lesión histopatológica característica, la cual se denomina "lesión de adherencia y destrucción" o lesión A/E ("attaching and effacing"). La lesión A/E es definida por la adherencia íntima entre la bacteria y la superficie epitelial y la destrucción (desaparición) de las microvellosidades de la célula hospedera (Fig. 1). La presencia de la lesión A/E parece estar asociada con la secreción de fluidos y la diarrea que es característica de la infección por EPEC (revisado por Law, 1994; Donnenberg y Kaper, 1992; Kaper, 1994; Donnenberg *et al.*, 1997). La formación de lesiones A/E involucra una serie compleja de eventos que ha sido dividida en tres etapas: adherencia inicial, transducción de señales y adherencia íntima (Donnenberg y Kaper, 1992; Donnenberg *et al.*, 1997).

TABLA 1

CLASES PRINCIPALES DE *Escherichia coli* DIARREOGÉNICA^a

Clase	Epidemiología	Fimbrias ^b	Interacción con enterocitos ^c	Toxinas
Enterotoxigénica (ETEC)	Diarrea infantil en países en desarrollo, diarrea del "viajero"	Clase 1 (987P) Clase 3 (K88, CFA/IV), Clase 4 (CFA/III, longus), Clase 5 (CFA/I, CFA/II)	Adherencia por medio de fimbrias sin cambios morfológicos en intestino distal. Patrón epitelial citotónico	Enterotoxinas LT1 y LTII; Sta: STp y STh; STb
Enteropatógena (EPEC)	Diarrea infantil crónica y aguda en países en desarrollo, casos esporádicos en países desarrollados	Clase 2 (FB171)? Clase 4 (BFP)	Adherencia localizada en intestino proximal; lesión A/E (adherencia íntima y destrucción de microvellosidades). Patrón epitelial reestructurante citotónico	
Enteroinvasiva (EIEC)	Disentería, diarrea usualmente en adultos		Invasión en células del colon; multiplicación interna, eventualmente muerte celular. Patrón invasivo transepitelial citotónico y citotóxico	SLT?, Enterotoxina EIET
Enterohemorrágica (STEC/EHEC)	Diarrea copiosa sanguinolenta, brotes en niños de países desarrollados. Síndrome urémico-hemolítico. Colitis hemorrágica	PO157?	Adherencia individual, lesión A/E, no invasiva. Patrón epitelial reestructurante citotónico. Efecto citotóxico?	Citotoxinas Stxs (SLTs), Enterohemolisina, EAST1?
Enteroagregativa (EAEC)	Diarrea persistente en infantes de países en desarrollo	Clase 2 (AAF/I, AAF/II) Clase 6 (Curli o fimbria GVVPQ)	Patrón de adherencia agregativa, pérdida de microvellosidades?, Citotoxicidad. Patrón epitelial citotónico	Enterotoxina EAST1, Hemolisina
Difusoadherente (DAEC)	Diarrea infantil, brotes en pacientes hospitalizados de países desarrollados	Clase 2 (F1845) AIDA-1?	Patrón de adherencia difusa, "incrustación" bacteriana entre microvellosidades	EAST1?

a) Revisado y modificado de Levine y Edelman, 1984, Levine, 1987; Salyers y Whitt, 1994; Kaper, 1994; Nataro y Kaper, 1998.

b) Clasificación revisada por Low *et al.*, 1996.

c) Revisado y modificado de Polotsky, 1994.

Adherencia localizada. La primera etapa involucra la adherencia no íntima de EPEC a las células intestinales, caracterizada por la adherencia de microcolonias bacterianas a la superficie celular. Este patrón de adherencia, llamado adherencia localizada (AL) es considerado una propiedad común de los serotipos clásicos de EPEC y es diferente de los patrones de adherencia difusa y agregativa que se observan en otras clases de *E. coli* diarreogénica (Cravioto *et al.*, 1979; Scaletsky *et al.*, 1984; Nataro *et al.*, 1985 y 1987).

El fenotipo de AL es dependiente de la presencia de un plásmido de aproximadamente 80 kb llamado EAF (“EPEC Adherence Factor”) (Fig. 1). Cepas carentes del plásmido EAF no muestran adherencia a las células epiteliales y son menos virulentas en pruebas con voluntarios (Baldini *et al.*, 1986; Knutton *et al.*, 1987; Nataro *et al.*, 1987; McConnell *et al.*, 1989; Vuopio-Varkila y Schoolnik, 1991).

El factor de adherencia de EPEC fue observado mediante microscopía electrónica por Girón *et al.*, (1991), en una cepa de EPEC cultivada sobre agar sangre. Estos autores identificaron un pili de 3 nm de diámetro, el cual se agrega para formar mechones que se entrelazan formando una red, en la cual quedan embebidas las células bacterianas, por lo que fue denominado BFP (“bundle-forming pilus”). El examen de las colonias de EPEC sobre la superficie de células epiteliales, muestra que estas estructuras son producidas dentro de las microcolonias adherentes, donde parecen formar uniones interbacterianas múltiples, las cuales se intersectan como una red tridimensional que puede estabilizar físicamente a la colonia adherida (Girón *et al.*, 1991).

La expresión de BFP se requiere para el desarrollo de microcolonias de EPEC sobre monocapas de células en cultivo de tejidos, donde se puede reproducir la AL (Baldini *et al.*, 1986; Knutton *et al.*, 1987; Nataro *et al.*, 1987) y la formación de agregados bacterianos esféricos en medio de cultivo de tejidos (autoagregación transitoria) (Vuopio-Varkila y Schoolnik, 1991). Evidencia reciente usando cultivo de órgano *in vitro* (IVOC) de intestino delgado infantil, indican que otras adhesinas diferentes de BFP inician la colonización de la superficie de la mucosa y que BFP permite la formación de microcolonias bacterianas tridimensionales vía interacciones

interbacterianas (Hicks *et al.*, 1998). Sin embargo, se ha mostrado en ensayos con voluntarios que para la producción de diarrea por EPEC se requiere del BFP funcional (Bieber *et al.*, 1998). Posiblemente en el fenómeno de autoagregación, tanto la fase de formación como la de dispersión sean requeridas para la virulencia, ya que la liberación de estos organismos podría conducir a la colonización de sitios epiteliales adicionales contribuyendo a la diseminación de la infección en el intestino (Bieber *et al.*, 1998).

La subunidad estructural principal BfpA que conforma el BFP está codificada por el gen *bfpA*, el cual se encuentra en el plásmido EAF. El plásmido EAF contiene una región de aproximadamente 11 kb, la cual incluye al operón *bfp*, que está conformado por 14 genes (*bfpA* a *bfpL*) que son necesarios para la biosíntesis, procesamiento y ensamblaje del BFP (Fig. 2) (Sohel *et al.*, 1996; Stone *et al.*, 1996). Los productos de los genes contenidos en el operón *bfp* comparten homología con proteínas que son requeridas para la biogénesis de la pilinas tipo IV, para la exportación de proteínas por la vía alternativa de secreción en bacterias Gram-negativas, o con proteínas involucradas en la toma de DNA por transformación en *Bacillus subtilis*. Estos genes son cotranscritos como parte de un operón modulado por señales ambientales (Puente *et al.*, 1996; Ramer *et al.*, 1996; Sohel *et al.*, 1996; Stone *et al.*, 1996).

BfpA es una proteína de aproximadamente 21 kDa, la cual está constituida de 193 aminoácidos, 13 de los cuales corresponden al péptido señal (Sohel *et al.*, 1993). La secuencia amino-terminal de la subunidad de BFP muestra homología con aquellas que constituyen los pilis de la familia tipo IV, los cuales han sido descritos en *Vibrio cholerae*, ETEC, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Bacteroides nodosus*, *Moraxella bovis*, *M. nonliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Kingella denitrificans* (Hobbs y Mattick, 1993; Strom y Lory, 1993). Con base en la similitud de sus secuencias amino terminales y al hecho de que EPEC, *Vibrio cholerae* y ETEC son patógenos intestinales, los pilis de estos organismos han sido reclasificados como tipo IV grupo B (Girón *et al.*, 1991; Donnenberg *et al.*, 1992; Sohel *et al.*, 1993; Girón *et al.*, 1994; Taniguchi *et al.*, 1995).

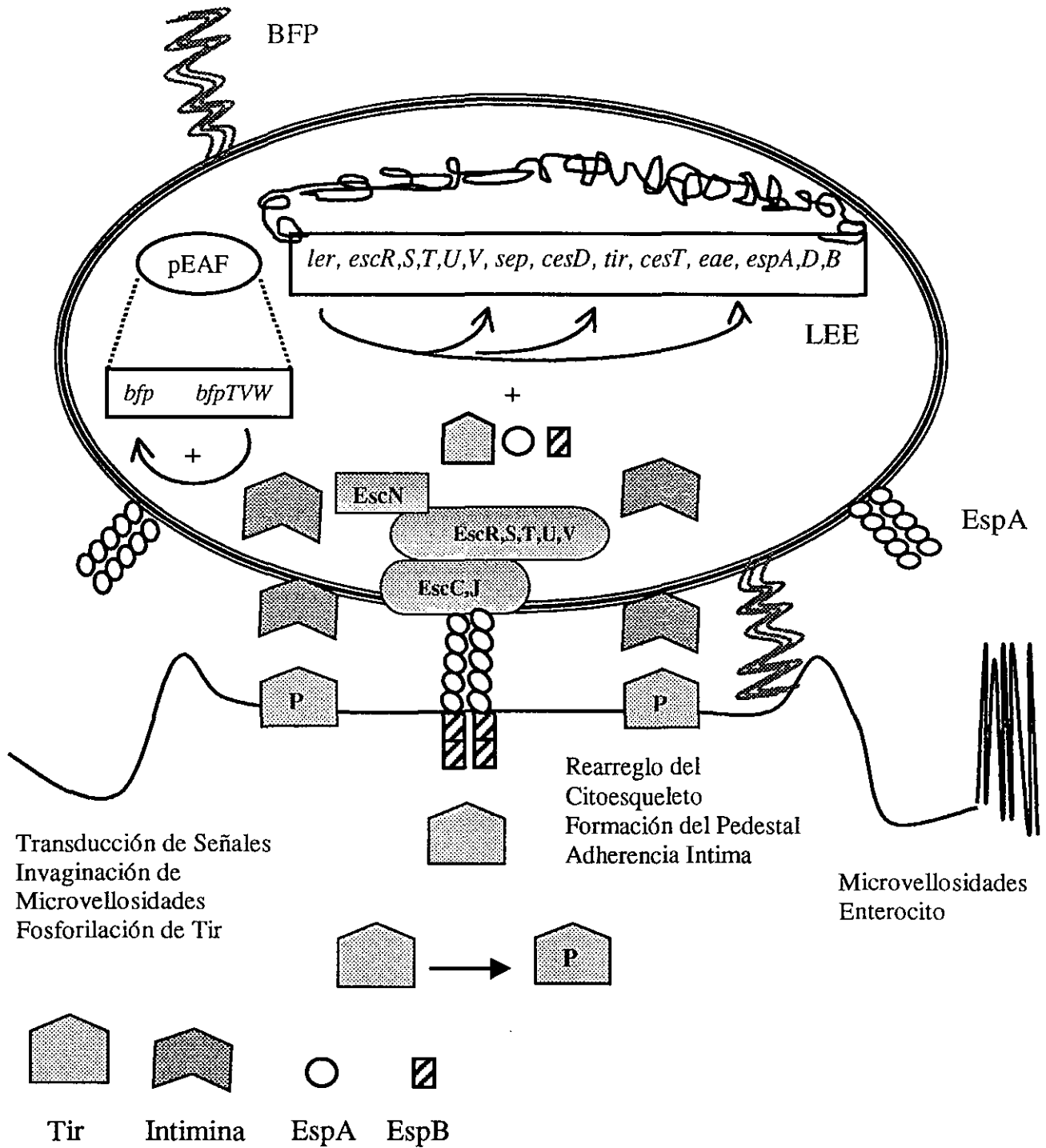


Fig.1. Interacciones de *Escherichia coli* enteropatógena con las células del hospedero. El locus para la destrucción del enterocito (LEE) codifica para genes bacterianos requeridos para la virulencia, incluyendo Tir, Intimina, proteínas secretadas (Esp) y un sistema de secreción tipo III (Esc). El plásmido EAF codifica los genes para la fimbria BFP. Estos genes de virulencia son regulados positivamente por los activadores BfpT (PerA) y Ler, codificados en el plásmido EAF y la región LEE del cromosoma de EPEC, respectivamente. Posterior a la secreción de Tir, EspA, B y D, ocurren varios eventos de transducción de señales que conducen a la formación de la lesión de adherencia y destrucción (lesión A/E).

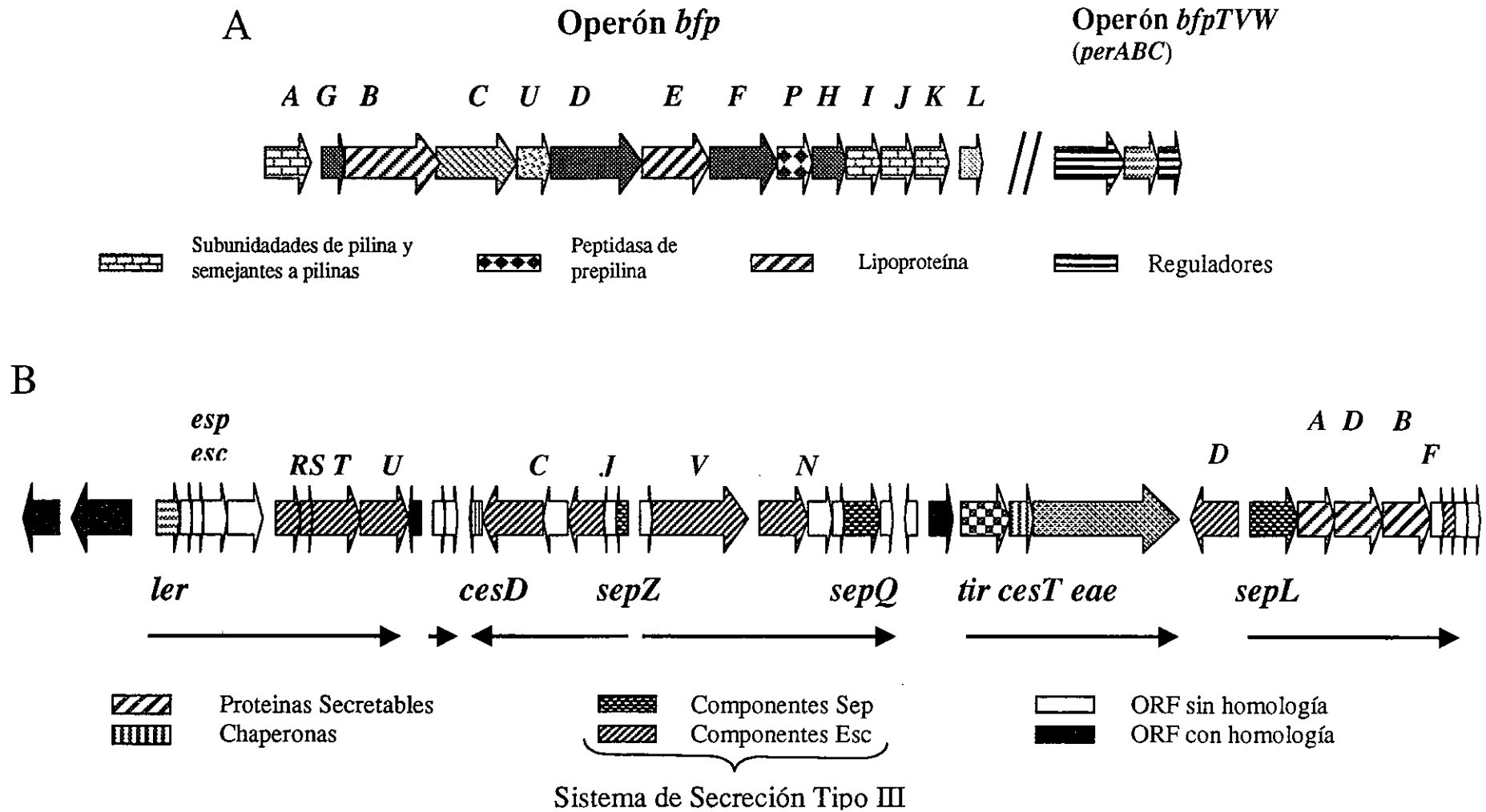


Fig. 2. Genes de *Escherichia coli* enteropatógena involucrados en la interacción con células hospederas. A) El plásmido EAF contiene el operón *bfp* (11.5 kb) que codifica para las proteínas involucradas en la biogénesis de la fimbria BFP responsable de la adherencia localizada (Sohel *et al.*, 1996) y el operón *bfpTVW*, el locus regulador I que codifica para BfpT, activador transcripcional del operón *bfp* (Tobe *et al.*, 1996). B) Región LEE ("Locus for Enterocyte Effacement"), isla de patogenicidad en el cromosoma de EPEC necesaria para la generación de la lesión A/E. Esta región contiene 41 presuntas fases abiertas de lectura que incluyen genes involucrados en la transducción de señales y la adherencia íntima. El gen *eae* codifica para la íntima y *tir* para su receptor, *cesT* para la chaperona de Tir y los genes *esp* para proteínas secretadas de EPEC. Los genes *esc* comparten homología con los componentes de los sistemas de secreción tipo III de otras bacterias patógenas Gram-negativas. El gene *ler*, es el locus activador II y está involucrado en la expresión de los genes *esc*, *eae*, *tir* y *sepZ*. Las flechas delgadas indican la probable organización transcripcional de los diferentes grupos de genes (Elliot *et al.*, 1998, Mellies *et al.*, 1999).

Transducción de señales. Cuando EPEC se une a las células epiteliales, provoca que varias señales del hospedero sean activadas. La transducción de señales desde la bacteria, induce la destrucción de las microvellosidades en un evento mediado por productos de genes que están codificados en una isla de patogenicidad de 35 kb llamada **locus LEE** o de destrucción del enterocito (Locus of Enterocyte Effacement) (McDaniel *et al.*, 1995; McDaniel y Kaper, 1997; Elliot *et al.*, 1998) (Fig. 2).

Esta región incluye los genes *esc* y *sep*, *espADB*, *tir* y *eae*. Los genes *eae* y *tir* codifican para la intimina (Jerse *et al.*, 1990) y su receptor Tir (Kenny *et al.*, 1997b), los cuales son requeridos para la adherencia íntima *in vitro*. El grupo de genes *esc* y *sep* codifica para un sistema de secreción tipo III responsable de la secreción de Tir y las proteínas EspA (Jarvis *et al.*, 1995, Kenny *et al.*, 1996), EspB (Donnenberg *et al.*, 1993) y EspD (Lai *et al.*, 1997). Durante esta segunda etapa, el grupo de proteínas Esp disparan la activación de las vías de transducción de señales conduciendo a una respuesta compleja por la célula epitelial (Foubister *et al.*, 1994b; Kenny y Finlay, 1995; Kenny *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 1997) (Fig. 1). Esta respuesta está caracterizada por la fosforilación de proteínas de la célula hospedera, tales como la fosfolipasa C, inducción de flujo de inositol fosfato y calcio, rearrreglos importantes del citoesqueleto y la disolución o desaparición de las microvellosidades (Manjarrez *et al.*, 1992; Rosenshine *et al.*, 1992; Foubister *et al.*, 1994a).

Recientemente ha sido mostrado que EspA es el componente mayoritario de un apéndice filamentosos en la superficie bacteriana, que se ha visto formar un puente que favorece la unión inicial de EPEC a la célula hospedera y se requiere para la translocación de las proteínas secretadas, tales como EspB (Knutton *et al.*, 1998; Wolff *et al.*, 1998) (Fig. 1).

Adherencia íntima. Finalmente, el producto del gen *eae*, una proteína de membrana externa llamada intimina, permite a EPEC reclutar y organizar la actina polimerizada y otras proteínas hospederas del citoesqueleto. Esto conduce a la formación de proyecciones tipo copa o pedestal de la membrana apical del enterocito, a las cuales EPEC se adhiere íntimamente a través de la interacción con la forma tirosina-fosforilada de Tir (una proteína translocada de origen bacteriano previamente llamada

Hp90), la cual constituye el receptor de la intimina (Rosenshine *et al.*, 1996; Kenny *et al.*, 1997b; Donnenberg *et al.*, 1997, Kaper, 1998) (Fig. 1).

Regulación de los factores de virulencia de EPEC.

La expresión de BFP es regulada a nivel transcripcional por un promotor corriente arriba de *bfpA*, el primer gen del operón *bfp*, este promotor es responsable de la regulación coordinada de los genes corriente abajo (Puente *et al.*, 1996; Ramer *et al.*, 1996; Bustamante *et al.*, 1998). La expresión de *bfpA* se induce principalmente durante la fase exponencial de crecimiento y es modulada por el tipo de medio de cultivo, la temperatura y la concentración de amonio (Puente *et al.*, 1996). Esta expresión requiere del producto del gen *bfpT*, el primero del operón *bfpTVW*. Este operón está localizado en el plásmido EAF y se encuentra aproximadamente a 18 kb río abajo de *bfpA* (Tobe *et al.*, 1996; Sanchez-SanMartín *et al.*, 1999).

El operón *bfpTVW*, previamente denominado como locus *per*, ha sido involucrado en la regulación del gen *eaе*, que está localizado en la región cromosomal LEE (Fig. 2) (Gómez-Duarte y Kaper, 1995), y en la producción y/o secreción de EspB y otras proteínas secretadas, las cuales también responden a las condiciones que regulan la expresión de *bfpA* (Kenny y Finlay, 1995; Kenny *et al.*, 1997a,b; Knutton *et al.*, 1997). No obstante, en un estudio reciente, se ha mostrado que *bfpTVW* no tiene un efecto significativo sobre la activación de la expresión de esos genes bajo las mismas condiciones que regulan la expresión de *bfpA* (Sanchez-SanMartín *et al.*, 1999).

El gen *bfpT* (también llamado *perA*) codifica para la proteína BfpT de 274 aminoácidos (31,4 kDa), que tiene homología con miembros de la familia AraC/XylS de reguladores transcripcionales. El dominio C-terminal de BfpT contiene una región estructural que asemeja la secuencia de hélice-vuelta-hélice encontrada en proteínas que se unen a DNA, así como la secuencia consenso en la familia AraC/XylS (Tobe *et al.*, 1996).

Las proteínas pertenecientes a esta familia parecen participar en tres principales funciones reguladoras: metabolismo de carbono, respuesta a estrés y patogénesis. Entre los reguladores involucrados en la patogénesis se encuentran aquellos que modulan la expresión de factores de virulencia asociados a la colonización del tracto gastrointestinal

y de los tractos respiratorio y urinario de mamíferos. Se han descrito reguladores transcripcionales de la expresión de fimbrias, de componentes de la cápsula celular, y de invasinas (Gallegos *et al.*, 1997).

Por su semejanza a nivel de secuencia de BfpT (PerA) parece pertenecer al grupo de reguladores positivos de la expresión de fimbrias en *E. coli* que incluye a: CfaR, Rns, CsvR, FapR (FasH) y AggR. Estos reguladores responden a una amplia variedad de condiciones que incluyen variaciones en el medio de cultivo, temperatura y tensión de oxígeno (Tabla 2) (Jordi *et al.*, 1992; Caron *et al.*, 1989; de Hann *et al.*, 1991; Klaasen y de Graaf, 1990; y Nataro *et al.*, 1994). De esta forma, este tipo de reguladores con Rns como prototipo, parece representar una subfamilia de homólogos a AraC especializados en la regulación de la expresión de fimbrias (Scott y Froehlich, 1993; Froehlich *et al.*, 1994). Otros miembros de la familia AraC regulan positivamente otros factores de virulencia también en patógenos entéricos. Por ejemplo, VirFy es el activador transcripcional del regulón de virulencia que incluye los genes *yop*, *ysc*, *yadA* y *ylpA* en *Yersinia enterocolitica* (Cornelis *et al.*, 1989); ToxT (TcpN) es el activador transcripcional de la expresión de la toxina del cólera y la fimbria TCP en *Vibrio cholerae* (Ogierman y Manning, 1992), y VirFs que es el activador transcripcional de los genes *virG* y *virB* en *Shigella* spp. VirB a su vez es el activador del regulón de virulencia *Shigella* spp (Sakai *et al.*, 1986, Kato *et al.*, 1989). Estos reguladores también son parte de la respuesta de los microorganismos a factores ambientales tales como temperatura, osmolaridad, pH del medio, y concentración de cationes; aunque, no ha sido demostrado que unan señales o factores específicos (Tabla 2) (Gallegos *et al.*, 1997).

TABLA 2

EJEMPLOS DE REGULADORES TRANSCRIPCIONALES DE LA FAMILIA AraC INVOLUCRADOS EN LA EXPRESION DE FACTORES DE VIRULENCIA EN BACTERIAS ENTEROPATOGENAS ^a

SISTEMA	ORGANISMO	PARAMETROS AMBIENTALES	REGULADOR ESPECIFICO ^b	REGULADOR GLOBAL ^c
Fimbria CFA/II	<i>E. coli</i> enterotoxigénica	Temperatura	Rns	H-NS ^d
Fimbria CFA/I	<i>E. coli</i> enterotoxigénica	Temperatura, Fierro	CfaR (CfaD)	H-NS, Fur
Fimbria 987P	<i>E. coli</i> enterotoxigénica	Medio de cultivo, pH, Temperatura	FasH (FapR)	H-NS, CRP
Fimbria AAF/II	<i>E. coli</i> enteroagregativa	Temperatura, pH	AggR	ND
Fimbria BFP	<i>E. coli</i> enteropatógena	Temperatura, Medio LB, Amonio, Fase de crecimiento	BfpT(PerA)	H-NS?,
Fimbria TCP	<i>Vibrio cholerae</i>	Temperatura, pH, Fierro, Osmolaridad	ToxT (TcpN)	ToxR
Genes de virulencia (<i>inv, ipa</i>)	<i>Shigella</i> , <i>E. coli</i> enteroinvasiva	Temperatura	VirFs	H-NS
Regulón de virulencia (<i>vir, lcr, yop</i>)	<i>Yersinia</i>	Temperatura, Calcio	VirFy	YmoA

a) Modificado de: Low *et al*, 1996; Mekalanos, 1992.

b) Proteína reguladora de la familia AraC

c) Reguladores globales conocidos a la fecha involucrados en respuesta a señales ambientales.

d) Proteína estructurante del nucleóide (Histone- like Nucleoid Structuring protein).

JUSTIFICACION

Basándonos en información obtenida de experimentos *in vitro* se puede proponer que la expresión de BFP muy probablemente es influida por factores ambientales presentes en el hospedero. Dado que la expresión de *bfpA* depende del regulador transcripcional BfpT, el cual podría estar detectando o respondiendo a las señales del medio y que el locus *bfpTVW* parece también participar en la expresión coordinada de otros determinantes de virulencia de EPEC, consideramos de especial importancia investigar la regulación transcripcional de *bfpT* en respuesta a algunas condiciones ambientales que afectan la expresión de *bfpA*.

El conocimiento de los mecanismos y elementos reguladores involucrados en la expresión genética de BFP en EPEC, y en particular de los mecanismos que regulan la expresión de *bfpT* o que modulan la actividad reguladora de BfpT, en respuesta a factores ambientales puede darnos elementos nos permitan:

- i) establecer la conexión entre las observaciones *in vitro* y la expresión de BFP durante la infección.
- ii) estudiar la regulación de otros genes involucrados en la biogénesis de BFP.
- iii) definir el papel de BfpT en la expresión coordinada de otros factores de virulencia y, por ende, su participación en la patogenia de EPEC; y
- iv) aportar al conocimiento sobre el mecanismo de funcionamiento de los reguladores transcripcionales de la familia AraC.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el mecanismo molecular por el cual se regula la expresión de BFP en EPEC: Identificar y caracterizar los elementos genéticos involucrados en la regulación transcripcional de *bfpT* y las condiciones ambientales que afectan su expresión.

Objetivos particulares

a) Analizar el efecto de los parámetros ambientales, nutricionales y fisiológicos, que afectan la expresión de *bfpA*, sobre la expresión de *bfpT*.

b) Determinar si existen otros factores en EPEC, además de BfpT, requeridos para activar y/o regular la expresión de *bfpT/bfpA*, en respuesta a diferentes señales.

Objetivos específicos

a) Construir fusiones transcripcionales *bfpT-cat*, con fragmentos de diferente longitud de la región promotora de *bfpT* y el gene de la cloranfenicol acetil transferasa.

b) Definir el sitio de inicio de transcripción del gen *bfpT* por "primer extension".

c) Analizar la influencia de la temperatura, la concentración de amonio, la fase de crecimiento y el medio de cultivo sobre la expresión de las fusiones *bfpT-cat* y el gen silvestre *bfpT*.

d) Analizar la expresión de las fusiones *bfpT-cat*, en una cepa mutante en *bfpT* y en cepas EPEC carentes ("curadas") del pEAF y en cepas de *E. coli* no enteropatógenas.

MATERIAL Y METODOS

Cepas bacterianas

B171-8 EPEC O111:NM, contiene el plásmido EAF (80 kb) y plásmido críptico (3 kb) (Sohel *et al.*, 1993).

B171-T::Gm^r Cepa mutante en *bfpT* (*bfpT*::Gm^r), derivada de B171-8 (Tobe *et al.*, 1996)

B171-10 Cepa derivada de B171-8, que carece del plásmido EAF y del plásmido críptico (Bustamante *et al.*, 1998).

MC4100 *araD139 DE(argF-lac)169 lam- flhD5301 fruA25 relA1 rpsL150(Str^r) rbsR22 deoC1* (Casadaban, 1976)

Plásmidos

pEAF Plásmido de 80 kb, característico en las cepas EPEC, que contiene los operones *bfp* y *bfpTVW* (Knutton *et al.*, 1987; Puente *et al.*, 1996; Tobe *et al.*, 1996).

pKK232-8 Plásmido derivado de pBR322 que contiene el gen sin promotor de la cloranfenicol acetiltransferasa (*cat*), Amp^r (Brosius, 1984).

pCAT232 Plásmido derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcriptional *bfpA-cat* a partir de los nucleótidos -232 a +76 (Puente *et al.*, 1996).

pBTA-BGL3 Plásmido derivado de pWKS130 que contiene un fragmento de *Bgl*II de 7.0 kb del plásmido EAF y que porta el operón *bfpTVW* (Tobe *et al.*, 1996).

pBTA-BH1 Plásmido derivado de pWKS130 que contiene un fragmento de *Bam*HI de 3.9 kb del plásmido EAF y que porta el operón *bfpTVW* (Tobe *et al.*, 1996).

pMPM-K3 Vector de clonación de bajo numero de copias, derivado de p15A. (Km^r) (Mayer, 1995).

pCS-T Plásmido derivado de pMPM-K3 que contiene el gen *bfpT* (Sánchez-SanMartín *et al.*, 1999).

pUST3800^a Plásmido derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *bfpT-cat* a partir de los nucleótidos -3800 a +69 (Este estudio)

- pUST700** Plásmido derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *bfpT-cat* a partir de los nucleótidos -700 a +69 (Este estudio)
- pUST304** Plásmido derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *bfpT-cat* a partir de los nucleótidos -304 a +69 (Este estudio).
- pUST258** Plásmido derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *bfpT-cat* a partir de los nucleótidos -258 a +69 (Este estudio).
- pUST166** Plásmido derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *bfpT-cat* a partir de los nucleótidos -166 a +69 (Este estudio).
- pUST156** Plásmido derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *bfpT-cat* a partir de los nucleótidos -156 a +69 (Este estudio).
- pUST128** Plásmido derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *bfpT-cat* a partir de los nucleótidos -128 a +69 (Este estudio).
- pUST102** Plásmido derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *bfpT-cat* a partir de los nucleótidos -102 a +69 (Este estudio).
- pUST81** Plásmido derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *bfpT-cat* a partir de los nucleótidos -81 a +69 (Este estudio).
- pUST66** Plásmido derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *bfpT-cat* a partir de los nucleótidos -66 a +69 (Este estudio).
- pUST54** Plásmido derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *bfpT-cat* a partir de los nucleótidos -54 a +69 (Este estudio).

a) La cifra en el nombre dado a cada plásmido indica la longitud en pb que contiene la fusión transcripcional con respecto al sitio de inicio de la transcripción de *bfpT*.

Condiciones de crecimiento.

Las cepas bacterianas se crecieron rutinariamente en medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989). Como fue descrito previamente por Puente *et al.* (1996), para inducir la expresión de *bfpA* se utilizó el medio DME ("Dulbecco's modified Eagle's

medium”) conteniendo glucosa (0.45%), L-glutamina (584 mg l^{-1})(DME 0.45%, Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y.), suplementado con 1% de LB, a 37°C o a otra temperatura tal como se indica en el texto. Para analizar la influencia del amonio se probaron las siguientes concentraciones de sulfato de amonio: 3, 6, 10, 15, o 20 mM. Para probar el efecto del pH, el DME 0.45% se preparó con 0.1M de ácido Morfolinpropanosulfónico (MOPS) como amortiguador y el pH fue ajustado a diferentes valores añadiendo NaOH o HCl. Para analizar el efecto de la osmolaridad, las cepas bacterianas se crecieron en DME 0.45% conteniendo 0.2, 0.3 o 0.4M de NaCl. Cuando fue necesario, se añadió al medio ampicilina o kanamicina (Sigma Chemical Co., ST Louis, MO) a una concentración de 100 y 25 $\mu g ml^{-1}$, respectivamente.

Los cultivos de prueba, para cualquier condición indicada en el texto, se iniciaron con un cultivo en LB llevado hasta una $DO_{600}=1.0$ del cual se hizo una suspensión bacteriana en amortiguador salino de fosfatos [PBS] pH7.4). Esta última suspensión se diluyó 1:50 en DME 0.45% (50 mililitros) y se incubó bajo agitación orbital a 200 r.p.m. (Gyromax 902, Amerex Instruments Inc., Lafayette, CA) a las temperaturas indicadas en el texto.

Se recolectaron muestras del cultivo cada hora entre la sexta y la novena hora de crecimiento para las determinaciones de las DO_{600} y la preparación del extracto a partir del cual se midió la actividad de CAT. Simultáneamente, también se tomaron muestras para las extracciones de RNA usadas en los ensayos de extensión inversa (“primer extension”).

En los experimentos para medir los efectos de la fase de crecimiento y del medio de cultivo, las células se crecieron a 37°C en DME o LB en las condiciones descritas anteriormente. Se tomaron muestras cada hora a lo largo de la curva de crecimiento determinando su DO_{600} y se midió la actividad de CAT.

Construcciones genéticas y análisis de la secuencia de DNA.

Todas las construcciones de DNA fueron realizadas por técnicas convencionales (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). El DNA plasmídico fue purificado usando un estuche de reactivos Qiagen (Qiagen Inc., Chatsworth, CA). Las enzimas de modificación y de restricción de DNA fueron obtenidas de Boehringer Mannheim (Boehringer Mannheim

GmbH, Mannheim, Germany) o Gibco BRL (Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y.) y fueron usadas de acuerdo a las instrucciones de los proveedores. Los oligonucleótidos usados para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y para ensayos tipo "primer extension" o de extensión inversa fueron obtenidos de Biosynthesis (Biosynthesis Inc., Lewisville, TX) o en la unidad de síntesis de oligonucleótidos del IBt/UNAM. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen de 100 µl usando AmpliTaq polimerasa (Perkin Elmer Corp., Branchburg, New Jersey) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Los oligonucleótidos fueron marcados con [γ - 32 P]ATP (6000 Ci/mmol) obtenidos de Du Pont (Du Pont NEN Research Products, Boston, MA).

La secuenciación de DNA de doble cadena de la región corriente arriba fue realizada por el procedimiento de terminación de la cadena con dideoxinucleótidos (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989) usando un estuche de reactivos para secuenciación con Thermosequenasa de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Amersham LIFE SCIENCE, Inc. Cleveland, Ohio). Los plásmidos pBTA-BH1, pBTA-GL3 (Tobe *et al.*, 1996) o la serie de fusiones pUST (Fig. 3) fueron usados como DNA molde.

Fusiones transcripcionales *bfpT-cat*.

Para medir la expresión de *bfpT* durante el crecimiento bajo diferentes condiciones, se utilizó como gen reportero a *cat*, el cual codifica para la enzima cloranfenicol acetil transferasa cuya actividad puede determinarse mediante un método espectrofotométrico que se describe mas adelante. El gen *lacZ* no pudo ser utilizado debido a la actividad basal del gen nativo en EPEC. A fin de generar las fusiones transcripcionales *bfpT-cat*, se amplificó por PCR una región corriente arriba del codón de inicio de *bfpT* de aproximadamente 240 pb. Para esto, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos iniciadores: iniciador inverso de M13 cuya secuencia está presente en pBTA-BH1 (un derivado de pWKS130, el cual porta un fragmento *Bam*H1 de 3.9 kb del pEAF conteniendo el locus *bfpTVW*) y el iniciador TAFCAT-HD3 que abarca las bases +32 a +59 con respecto al codon de inicio de *bfpT* y crea un sitio de corte para *Hind*III.

Para generar el plásmido pUST166 (Fig 3), el fragmento resultante de la

amplificación por PCR fue digerido con *HindIII* y *BamHI* y clonado en pKK232-8 digerido con *BamHI* y *HindIII*. Para generar los plásmidos pUST102 y pUST54, el fragmento fue digerido de forma independiente con *HaeIII* y *DraI*, los fragmentos resultantes fueron clonados en pKK232-8 digerido con *HindIII* y *SmaI*. Este vector contiene el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (*cat*) sin promotor (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden).

Para generar los plásmidos pUST156, pUST128, pUST81 y pUST66 (Fig 3), se siguió el mismo procedimiento, pero el oligonucleótido iniciador inverso de M13 fue sustituido por los iniciadores UBfpT183F, TAFCAT155 (el cual crea un sitio de corte para *BamHI*), UBfpT81F y UBfpT66F, que corresponden a las posiciones -164 a -184, -147 a -168, -88 a -108 y -81 a la -93, respectivamente, corriente arriba del codon de inicio para *bfpT*.

A fin de generar fusiones transcripcionales *bfpT-cat* más largas, un fragmento *XbaI/SalI* de aprox. 7.0 kb obtenido del pBTA-BGL3 (un derivado de pWKS130 el cual porta un fragmento de *BglII* de 7.0 kb del pEAF conteniendo el locus *bfpTVW*), fue inicialmente digerido con *BamHI*. Para generar los plásmidos pUST3800, pUST700, pUST304 y pUST258 (Fig 3), el fragmento resultante de aproximadamente 5.2 kb fue totalmente digerido con *EcoRV*, *PvuII*, *StyI* o *RsaI*, respectivamente, y clonado en pUST166 digerido con *BamHI* y *SmaI*.

Ensayo de actividad para CAT.

El ensayo de cloranfenicol acetiltransferasa fue realizado como se describió previamente (Puente *et al*, 1996). Los extractos crudos fueron preparados lavando 1.0 ml de muestra de células en amortiguador TDTT (50mM de Tris-HCL, pH 7.8 and 30µM de DL-ditiotreitol), resuspendiendo posteriormente en 0.5 ml de amortiguador TDTT y sonicando con lapsos de 10 segundos hasta que la suspensión bacteriana pierda la turbidez. Las muestras fueron centrifugadas a 16000g durante 15 min a 4°C para separar las células enteras y restos celulares. Alícuotas de 5 µl de cada extracto fueron adicionadas por duplicado a una placa de microtitulación de 96 pozos y fueron ensayados por la adición de 200 µl de la mezcla de reacción conteniendo: 1mM de DNTB (ácido 5,5'-

ditio-bis(2-nitrobenzoico)) (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany), 0.1 M de Tris-HCl pH7.8, 0.1 mM de acetil-CoA (Pharmacia LKB Biotech Inc. Alameda, CA) y 0.1 mM de cloranfenicol (Sigma Chemical Co., ST Louis, MO). Los cambios en la absorbancia a 410 nm fueron registrados cada 5 seg durante 3 min de reacción con un lector automático de barrido para microplacas, Ceres 900C y el "software" KC3™ (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT) posicionado en modo de cinética.

Una curva estándar (de 0 a 2500 U/ml) de cloranfenicol acetiltransferasa (Sigma Chemical Co., ST Louis, MO) se usó para interpolar las actividades de cada muestra. Para calcular la actividad específica de CAT, se determinaron las concentraciones de proteínas en los extractos celulares usando un estuche de reactivos (Pierce, Rockford, IL). Albúmina de suero bovino se usó como proteína estándar.

Aislamiento de RNA y análisis por ensayos de extensión inversa ("primer extension")

El RNA total se aisló y purificó usando el estuche de reactivos RNeasy® Qiagen, según instrucciones del proveedor (Qiagen Inc., Chatsworth, CA). Las lecturas de A_{260} y A_{280} se tomaron para determinar la pureza y la concentración del RNA obtenido. El sitio de inicio de transcripción del gen *bfpT* y de la fusión *bfpT-cat* se determinó por el análisis del producto de DNA complementario (cDNA) generado por ensayos de extensión inversa usando como iniciadores a los oligonucleótidos BfpT351R y SeqCAT1, los cuales son complementarios a las posiciones +84 a +98 y +13 a +31 con respecto a los codones de inicio de *bfpT* y *cat*, respectivamente, e hibridándolos al RNA total. Las reacciones de extensión inversa fueron realizadas por modificación del procedimiento reportado por Barrios *et al.* (1995). Los iniciadores fueron marcados en el extremo 5' con [γ - 32 P] ATP con polinucleótidocinasa del fago T4, e hibridado con 15 o 5 μ g (determinado por densidad óptica a 260 nm) de RNA total aislado de muestras de cultivo en fase exponencial (4h, $DO_{600}=0.4$) de la cepa B171-8 y sus derivadas crecidas en DME 0.45% a 37°C. La reacción de alineamiento se realizó por calentamiento de las muestras a 90°C durante 3 min en 0.2M de NaCl/0.03M Tris-HCl pH=8.0, posteriormente fue enfriado lentamente hasta 37°C (aprox. 1h). Los transcritos fueron extendidos con 10 unidades de transcriptasa reversa del

virus de la mieloblastosis aviaria (AMV) (Boehringer Mannheim, GmbH, Mannheim, Germany) por 1h a 45°C en 1X del amortiguador para la reacción de transcripción reversa, 1mM de dithiothreitol, 0.27 mM (cada uno) de dinucleósido trifosfatos y 1.3 U de inhibidor de RNasa (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) por μ l del volumen de reacción. Las muestras fueron concentradas y purificadas a través de columnas concentradoras Microcon-10® (Amicon Inc., Beverly, MA) de acuerdo a instrucciones del fabricante. Los productos de extensión fueron separados por electroforesis en un gel para secuenciación de 8% de polyacrilamida, 7M de urea y amortiguador de boratos (TBE). Para ubicar el sitio de inicio de la transcripción, se realizaron reacciones de secuencia usando los mismos iniciadores y los plásmidos pBTA-BH1 (Tobe *et al.*, 1996) y pUST166 como moldes de DNA.

Ensayos de Hibridación tipo "Slot blot"

La hibridación RNA-DNA tipo "slot blot" se realizó en membranas de nylon (Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, Germany), en las cuales se aplicaron 5 μ g de RNA total desnaturalizado por cada pozo y se fijaron por vacío usando un aparato PR600 (Slot Blot Apparatus, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las sondas de DNA se generaron mediante amplificación por PCR de regiones codificantes de *bfpA* o *bfpT* usando como molde el plásmido EAF y de la región codificante de *cat* usando como templado al pKK232-8. Los fragmentos de DNA se marcaron con [γ -³²P]dCTP usando un estuche de reactivos para marcaje "random primer" (Amersham Life Sciences Inc.; Cleveland OH, USA). La pre-hibridación y hibridación se llevaron a cabo a 42°C por 4 h y 18 h, respectivamente, en 50% de formamida, 6x SSC, 2x Denhardtts solución/200 mg ml⁻¹ de DNA de esperma de salmón (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Los filtros se lavaron con 0.2x SSC, 0.1% SDS, y se expusieron a una película de rayos X durante 24 horas.

RESULTADOS

Identificación de secuencias requeridas para la expresión de *bfpT*, usando fusiones transcripcionales *bfpT-cat*.

Previamente se mostró que las fusiones *bfpA-cat* podían ser usadas para medir la expresión de *bfpA* bajo diferentes condiciones de crecimiento (Puente *et al.*, 1996). Así, a fin de delimitar las secuencias corriente arriba necesarias para la expresión de *bfpT*, se construyeron fusiones transcripcionales en el vector pKK232-8 (que contiene el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (*cat*) sin promotor). Las fusiones se generaron clonando fragmentos de diferente tamaño, que en forma común contienen los 14 codones iniciales de la región estructural de *bfpT* y progresivamente secuencias más largas entre los nucleótidos -54 y -3800 con respecto del sitio de inicio de la transcripción de *bfpT*.

Los plásmidos resultantes (Fig. 3) fueron transformados a las cepas EPEC B171-8, EPEC B171-T::Gm^r (*bfpT* menos) y a *E. coli* K-12 MC4100 (ver Material y Métodos). La expresión de cada una de estas fusiones fue analizada mediante la determinación de la actividad de CAT producida en EPEC B171-8 crecida bajo condiciones óptimas para la expresión de *bfpA*, es decir en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's) a 37°C (Puente *et al.*, 1996). Fusiones diferentes que abarcan fragmentos entre las posiciones -81 y -3846 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (ver más adelante), expresaron cantidades equivalentes de CAT. Sin embargo, fusiones hasta las posiciones -54 y -66 (UST54 y UST66) sólo expresaron el 4 y 10% de la actividad, respectivamente, con respecto a la fusión que contiene un fragmento hasta la posición -81 (UST81), indicando que esta última fusión posee las secuencias necesarias para la expresión óptima de *bfpT*. De acuerdo a la localización del inicio de transcripción, la fusiones UST54 y UST66 contienen los elementos del promotor, pero carecen de elementos necesarios para su activación (Fig. 5).

Localización del sitio de inicio de la transcripción de *bfpT*.

La secuencia nucleotídica de la región codificante de *bfpT* (*perA*) fue reportada previamente (Gómez-Duarte and Kaper, 1995, Tobe *et al.*, 1996). *bfpT* es el primer gen

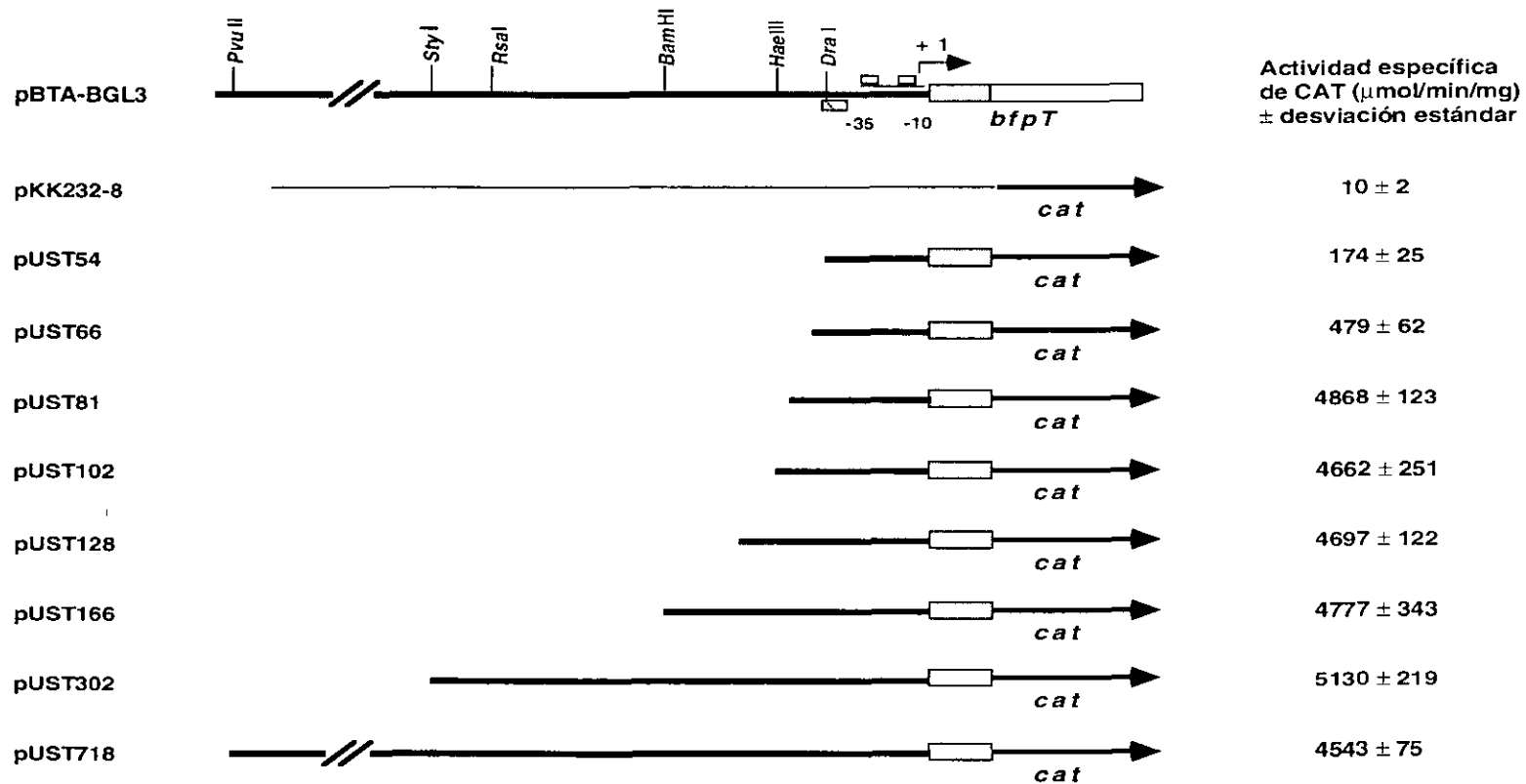


Fig. 3. Actividad de las fusiones transcripcionales *bfpT-cat*. Representación esquemática de las fusiones transcripcionales *bfpT-cat*. Las remociones de fragmentos de DNA de la región 5' de *bfpT* fueron generadas por clonación de fragmentos generados por PCR o con enzimas de restricción, en el vector pKK232-8, el cual contiene el gen de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (*cat*) sin promotor. Las denominaciones de los plásmidos denotan el tamaño del fragmento fusionado al gen *cat*, a partir del sitio de inicio de la transcripción de *bfpT*. Los sitios de restricción usados para la construcción de los plásmidos pUST54, -102, -166, -258, -302 y -718, el presunto sitio de unión para BfpT (PBBS) en *bfpT* y los elementos -35 y -10 del presunto promotor son indicados. La expresión de las fusiones *bfpT-cat* fue medida como la máxima actividad de CAT producida por cultivos, en DME a 37°C, de la cepa EPEC B171-8 llevando cada uno de los plásmidos. Los valores son el promedio de por los menos cuatro diferentes experimentos. Los valores indicados para pKK232-8 corresponden a los niveles basales de actividad de CAT.

del operón *bfpTVW* (también llamado locus *perABC*) el cual reside en el plásmido EAF, 6.7 kb “corriente abajo” del operón *bfp* (Sohel *et al.*, 1996; Tobe *et al.*, 1996)

Con el fin de localizar el inicio de transcripción y el probable promotor de *bfpT*, se llevaron a cabo ensayos de “primer extension”. RNA total de la cepa de EPEC B171-8, crecida por 4 h ($DO_{600}= 0.6$) en DME 0.45% a 37°C, se hibridó con un oligonucleótido iniciador específico para la región estructural de *bfpT* y se realizaron reacciones de extensión con transcriptasa reversa. Este oligonucleótido también se usó en una reacción de secuencia de DNA para determinar el tamaño del producto de la reacción de extensión, el cual comenzó en un residuo de G, 27 bp “corriente arriba” del codon inicial de *bfpT* (Fig. 4A y B).

El análisis por “primer extension” se usó también para estimar la posición del extremo 5' y el nivel de expresión del RNA mensajero de las fusiones *bfpT-cat*. RNA total preparado a partir de las cepas EPEC B171-8 y B171-T::Gm^r (*bfpT* menos), conteniendo la fusión UST166 y B171-8 conteniendo la fusión UST54, crecidas por 4h ($OD_{600}= 0.6$) en DME 0.45% a 37°C, se hibridó a un oligonucleótido específico para la región codificante de *cat*. La reacción de transcripción reversa usando el RNAm de la cepa B171-8/pUST166 (Fig. 4B, carril 2) generó un cDNA el cual comigró con el mismo residuo de G identificado en el RNAm de *bfpT* (Fig. 4A). La señal mas débil observada en la Fig. 4B (carril 1) correlaciona con la baja expresión de actividad de CAT mostrada por la cepa conteniendo la fusion UST54 (Fig. 3). Por otra parte, la producción del transcrito de *bfpT-cat* se redujo dramáticamente en la cepa B171-T::Gm^r (*bfpT* menos).

Estos datos y el análisis de la región “corriente arriba” de *bfpT*, condujeron a la identificación de un promotor dependiente de sigma-70 entre los nucleótidos -33 y -61, respecto al codón inicial de *bfpT* (Fig. 5). El análisis posterior de esta región permitió la identificación de un presunto sitio de unión a ribosomas (ATGAAGG), 7 nucleótidos hacia arriba del codon inicial de *bfpT*. Además del promotor, la secuencia mínima necesaria para la expresión de *bfpT* presenta un alto contenido de *AT* y secuencias repetidas invertidas (Fig. 5).

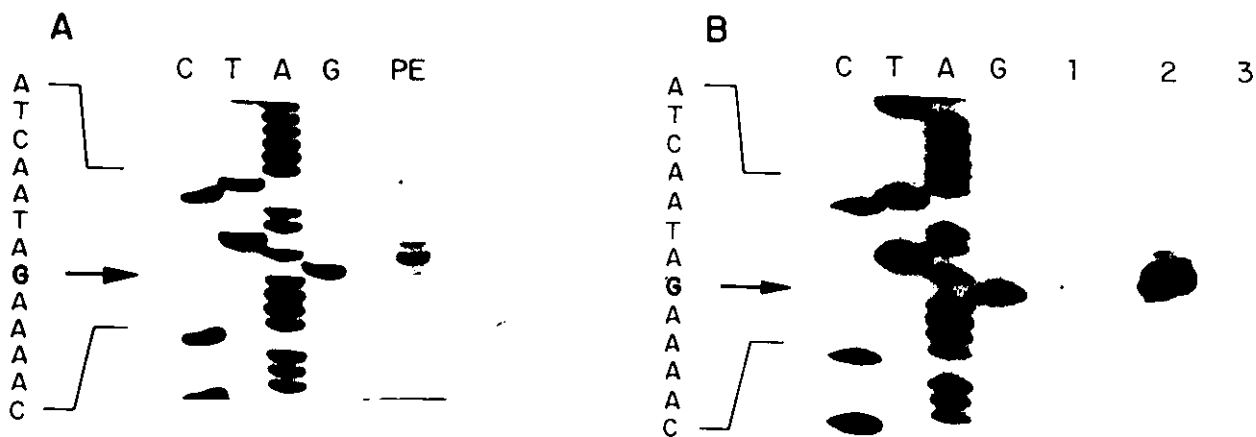


Fig. 4 Análisis del promotor de *bfpT*. (A) Mapeo del sitio de inicio de la transcripción de *bfpT* por ensayos de extensión inversa. RNA total fue extraído de muestras de cultivos de la cepa B171-8, recolectadas después de 4 hrs de crecimiento ($DO_{600} = 0.6$) en DME a 37°C . Un oligonucleótido iniciador, marcado con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, específico para la región estructural de *bfpT*, fue utilizado para la reacción de extensión usando transcriptasa reversa y RNAm de *bfpT* como molde (15 μg de RNA total). La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción identificado 27 nucleótidos hacia arriba del codón inicial de *bfpT* (carril PE).

(B) Análisis de la transcripción de la fusión *bfpT-cat* por reacciones de extensión inversa. RNA total fue extraído de muestras de cultivos de la cepas B171-8/pUST54 (carril 1), B171-8/pUST166 (carril 2) and B171-T::Gm' (*bfpT*menos)/pUST166 (carril 3), recolectadas después de 4 hrs de crecimiento ($DO_{600} = 0.6$) en DME a 37°C . Un oligonucleótido iniciador, marcado con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, específico para la región estructural de *cat*, fue utilizado para la reacción de extensión usando transcriptasa reversa y RNAm de *bfpT-cat* como molde (5 μg de RNA total por reacción). La flecha indica el mismo sitio de inicio de la transcripción identificado para *bfpT* (carriles 1 y 2).

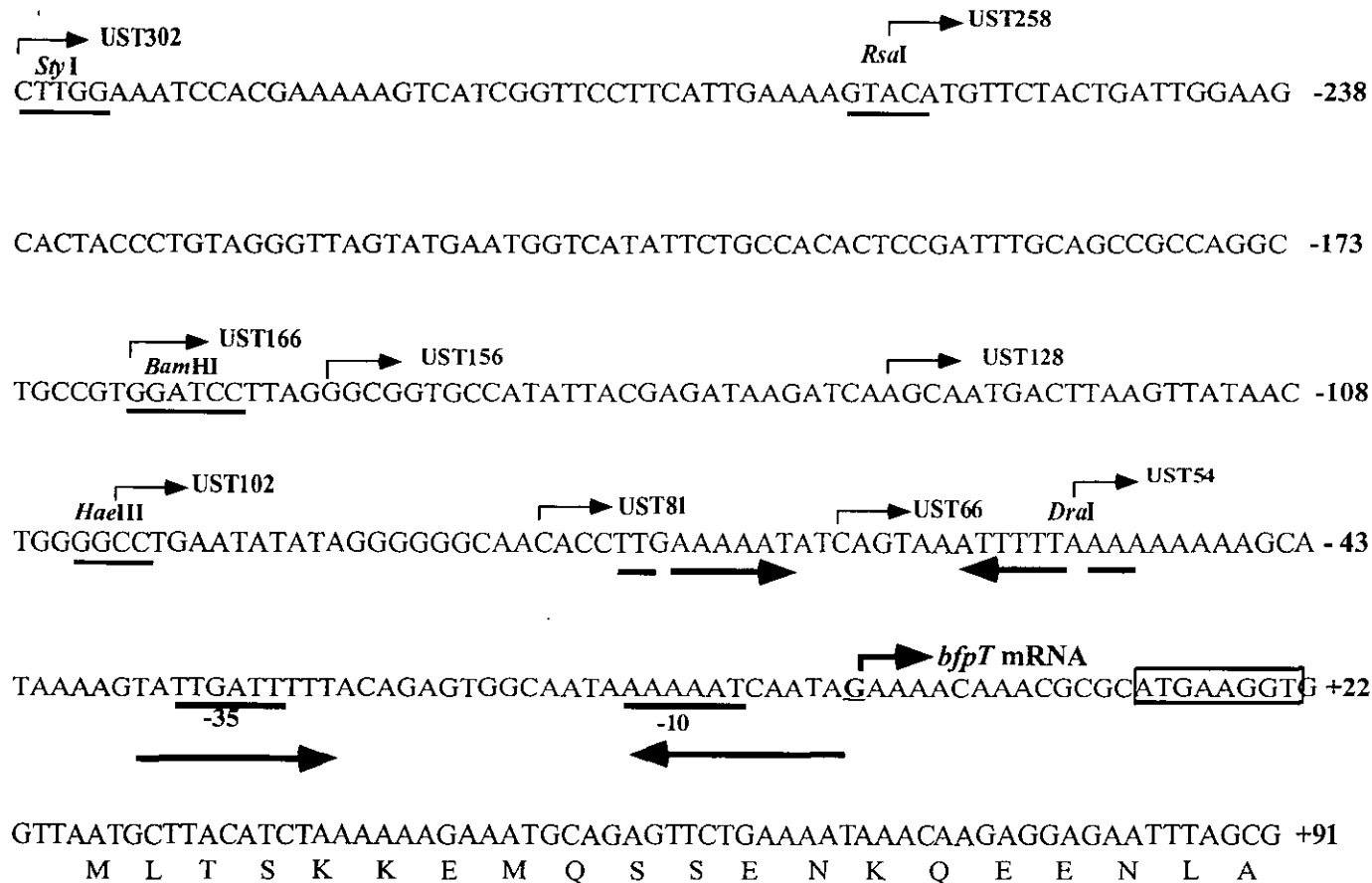


Fig. 5. Secuencia nucleotídica de la región reguladora de *bfpT*. La G en negrita y subrayada indica el sitio de inicio de la transcripción de *bfpT*. Los elementos del presunto promotor, las secuencias consenso -35 y -10 (subrayada), fueron localizados de acuerdo a los resultados de los ensayos de extensión inversa descritos en la Fig. 4 (ver panel A y B, y Fig. 12A). La presunta secuencia de Shine-Dalgarno (RBS) está enmarcada por un rectángulo. Las flechas horizontales muestran elementos simétricos invertidos y repetidos. Los fragmentos de la región reguladora usadas para la construcción de las fusiones *bfpT-cat* son indicadas con flechas dobladas; los numeros indican la distancia del sitio de inicio de la transcripción de *bfpT*.

Autoregulación positiva de *bfpT*

Las fusiones *bfpT-cat* en una cepa no enteropatógena de *E. coli* (MC4100) o en una cepa de EPEC carente del pEAF (B171-10) no fueron activas en las mismas condiciones que inducen su expresión en la cepa silvestre B171-8 (datos no mostrados). Estos datos indicaron que un gen presente en el pEAF era necesario para activar la expresión de *bfpT*.

Para explorar el probable papel de *bfpT* en su propia transcripción, se analizó la expresión de las fusiones de *bfpA-cat* y *bfpT-cat* en una cepa mutante en *bfpT*, al cual se le insertó el gen que codifica para la resistencia a gentamicina (B171-T::Gm^r) (Tobe *et al.*, 1996). La cepa B171-T::Gm^r se transformó con el plásmido pCAT232 (fusión *bfpA-cat*) (Puente *et al.*, 1996) o con el plásmido pUST166 (fusión *bfpT-cat*), se creció en DME a 37°C y la actividad específica de CAT se determinó después de 10 horas de crecimiento (DO₆₀₀= 1.4). En ausencia de *bfpT*, la actividad transcripcional de ambas fusiones prácticamente fue nula (Fig. 6), lo que sugiere que *bfpT* y *bfpA* necesitan de un gen *bfpT* funcional para su expresión.

Para corroborar si BfpT promueve su propia transcripción, se realizaron experimentos de complementación en una cepa EPEC "curada" del plásmido EAF (B171-10) y una cepa no enteropatógena de *E. coli* (MC4100). La expresión de las fusiones *bfpA-cat* y *bfpT-cat* se midió en *E. coli* MC4100 conteniendo el plásmido pCS-T (un derivado del vector pMPM-K3 que porta el gen *bfpT*) y *E. coli* B171-10 (pEAF menos)/pCS-T. Cuando *bfpT* fue colocado en *trans* a las fusiones, la transcripción de éstas se indujo a niveles similares a los obtenidos en la cepa silvestre de EPEC (B171-8)(Fig 6). De esta manera, la expresión de *bfpA* y *bfpT* requiere de la presencia del gen *bfpT* funcional en un plásmido compatible, apoyando la observación realizada en la cepa mutante en *bfpT*.

Por otra parte, la detección del RNA mensajero de *bfpT* silvestre y de la fusión *bfpT-cat*, a través de ensayos de extensión con transcriptasa reversa utilizando RNA mensajero de la cepa de EPEC mutante en *bfpT* (B171-T::Gm^r/pUST166), mostró que la expresión de *bfpT* requiere de un producto funcional de BfpT (Fig. 4B, línea 3). Estos resultados nos permitieron concluir que *bfpT* se autorregula positivamente.

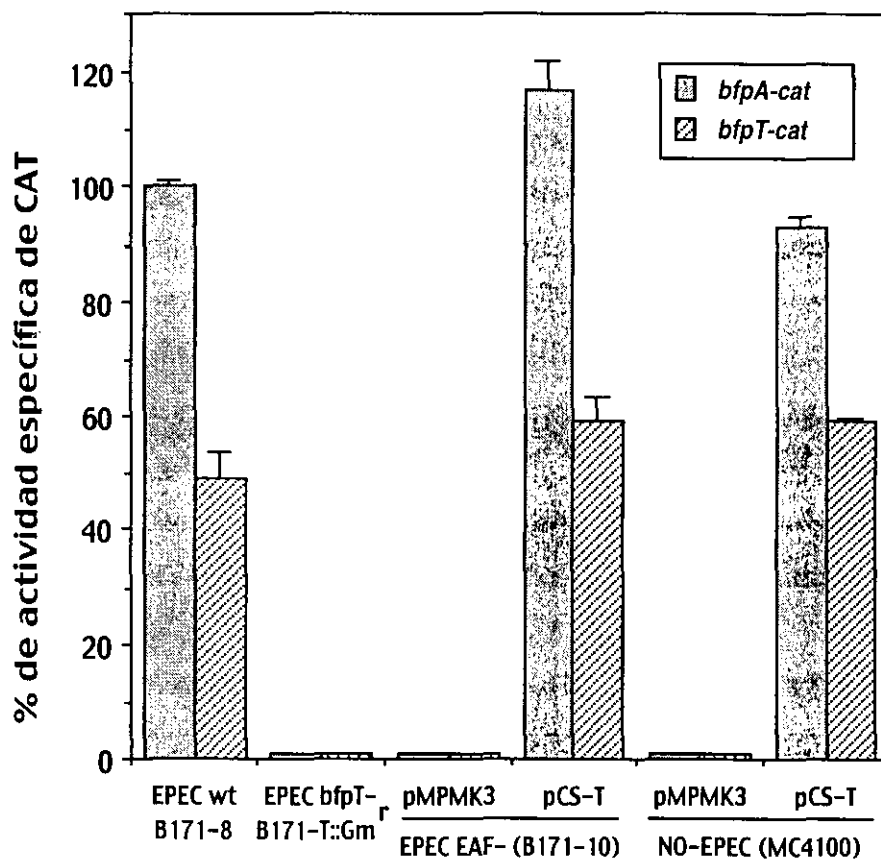


Fig. 6. Expresión de *bfpT* requiere de la presencia de una proteína BfpT funcional. Las cepas EPEC B171-8 (wt), y B171-T::GmR, una cepa mutante en *bfpT* derivada de B171-8, y B171-10 una cepa curada del plásmido EAF, derivada de B171-8, conteniendo el plásmido pMPPM-K3 (vector de clonación) o pCS-T (derivado del pMPPM-K3 portando el gen *bfpT*), y cepas de *E. coli* MC4100/pMPPM-K3 y MC4100/pCS-T, fueron transformadas con pCAT232 (fusión *bfpA-cat*) o pUST166 (fusión *bfpT-cat*) y crecidas en DME a 37°C. La actividad específica de CAT fue determinada en cultivos crecidos hasta DO600=1.4 y graficada como porcentaje de la actividad de CAT de la fusión *bfpA-cat* en la cepa silvestre EPEC B171-8.

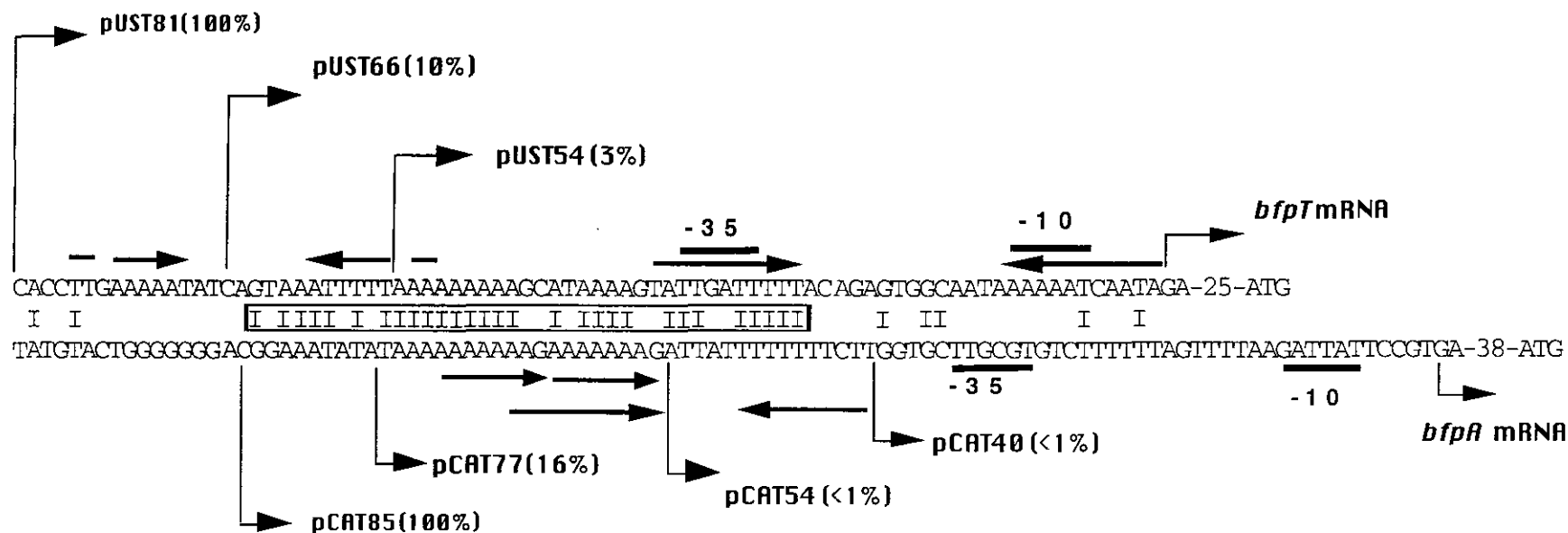


Fig. 7. Homología entre las regiones reguladoras mínimas *debfpA* (secuencia de abajo) y *bfpT* (secuencia de arriba). Las secuencias homólogas en las posiciones -85 y -46 en *bfpA* y -65 y -26 en *bfpT* muestran un trecho rico en A-T requerido para la regulación y autoactivación dependientes de BfpT, respectivamente. Los valores entre paréntesis son actividades expresadas como porcentajes de la actividad de pCAT232 (*bfpA-cat*) y pUST166 (*bfpT-cat*) a los cuales se les asignó el 100%. Los elementos de los presuntos promotores (secuencias consenso -35 y -10) están señalados con barras horizontales y los sitios de inicio de transcripción están indicados como *bfpT* mRNA y *bfpA* mRNA. Las secuencias repetidas invertidas y repetidas directas se indican por flechas horizontales.

La expresión de la actividad de CAT de las fusiones *bfpA-cat* y *bfpT-cat* se incrementó en la fase logarítmica temprana; sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con *bfpA*, la expresión de *bfpT* se extiende a la fase estacionaria temprana (Fig. 8B). La actividad de CAT producida durante la fase exponencial parece ser constante; sin embargo, para el caso de *bfpT* resulta en una máxima acumulación después de 11 horas de crecimiento (Fig. 8A y B). Cabe señalar que, no se observaron diferencias en las cinéticas de crecimiento de las cepas EPEC B171-8, llevando cada una de las fusiones, en DME a 37°C (Fig. 8A y B).

Esta observación fue confirmada por experimentos de hibridación RNA-DNA, con muestras de RNA total de la cepa EPEC B171-8 tomadas a diferentes horas de crecimiento celular e hibridadas con sondas específicas para *bfpT* y *bfpA*. Para ambos genes, la cantidad del RNAm se incrementó dramáticamente durante la fase exponencial de crecimiento, alcanzando el máximo después de la quinta hora, sin embargo para *bfpT* los niveles de RNAm se mantienen constantes aún después de ocho horas (Fig. 9). De esta manera la expresión de *bfpA* y *bfpT* no sigue un patrón similar, además de que la transcripción de *bfpT* mostró un nivel de expresión por lo menos dos veces mas bajo que la de *bfpA*, como lo muestran las actividades de las fusiones *bfpA-cat* y *bfpT-cat* (Fig. 8A y B). Estos resultados sugieren que *bfpT* no es regulado por las señales o los factores presentes en la fase estacionaria de crecimiento que afectan a *bfpA*.

***bfpA* y *bfpT* son regulados de manera similar por el crecimiento en medio LB, la concentración de amonio y la temperatura.**

En estudios previos, se mostró que la expresión de BFP ocurre a temperaturas entre 35 y 37°C pero no a temperaturas extremas (25°C y 41°C), y que la expresión de *bfpA* y *bfpB* fue significativamente reducida cuando EPEC B171-8 fue crecida en medio LB o DME suplementado con sulfato de amonio (Puente *et al.*, 1996; Ramer *et al.*, 1996). De esta manera, es probable que la diferencia en los niveles de BfpT pueda ser uno de los factores que contribuyan a la regulación de BFP por el medio de cultivo, la concentración de amonio y la temperatura.

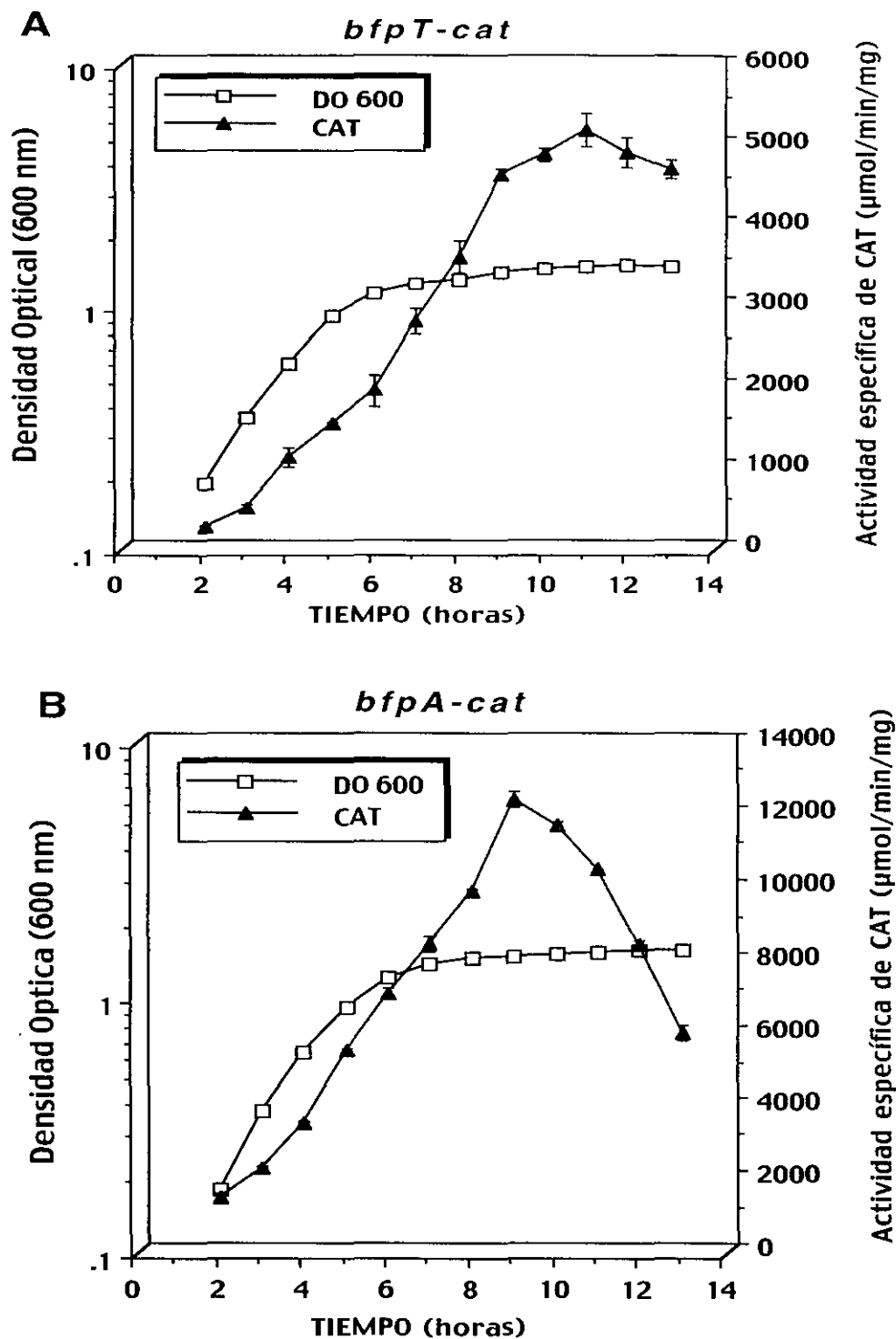


Fig. 8. La expresión de *bfpT* en EPEC B171-8 ocurre durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria temprana. El efecto de la fase de crecimiento sobre la expresión de las fusiones transcripcionales *bfpT-cat* (A) y *bfpA-cat* (B) fue analizado midiendo la actividad de CAT (triángulos) en muestras de cultivos tomadas cada hora de las cepas B171-8/pCAT232 y B171-8/pUST166, creciendo a 37°C en DME. La fase de crecimiento fue determinada por las mediciones de la densidad óptica a 600 nm (cuadrados) de muestras de los cultivos tomadas cada hora. Los valores corresponden al promedio de por lo menos tres experimentos diferentes.

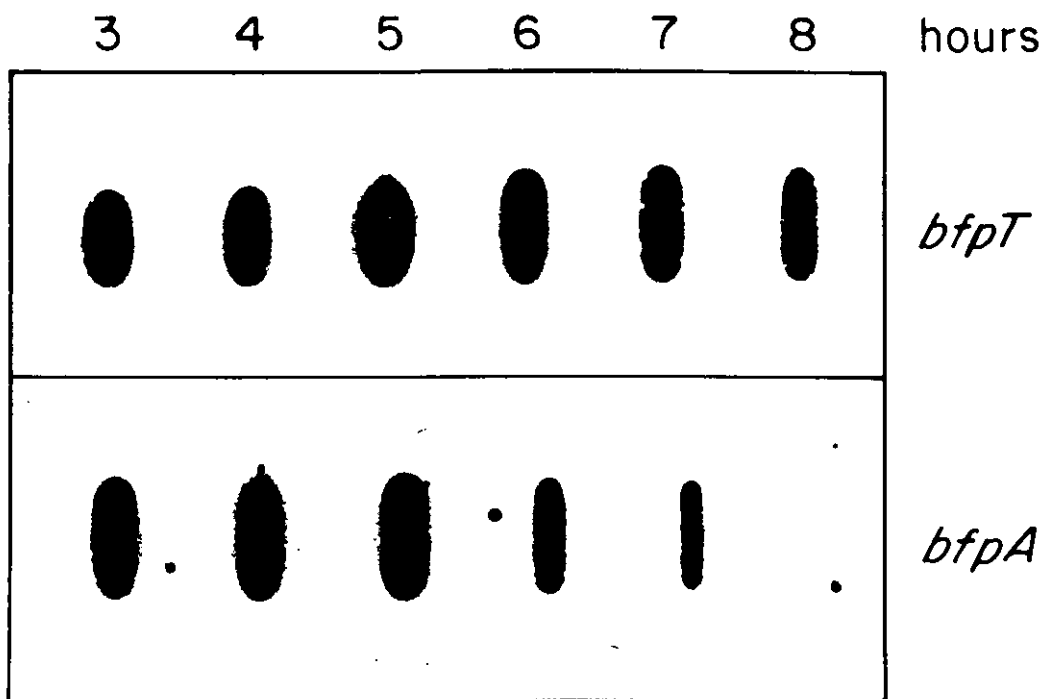


Fig. 9. Efecto de la fase de crecimiento sobre la transcripción de *bfpT* y *bfpA* en EPEC B171-8. RNA total fue extraído de muestras de cultivos de la cepas B171-8/pUST166 y B171-8/pCAT232 y recolectadas a diferentes horas de crecimiento en DME a 37°C. Para los ensayos de hibridación tipo "slot blot", se cargaron 5 µg de RNA total en cada pozo. Los RNA mensajeros *bfpT* y *bfpA* fueron detectados usando sondas de DNA específicas a las regiones codificantes de ambos genes marcadas con [α -³²P]CTP. Para *bfpA*, el nivel máximo de transcrito fue alcanzado a la quinta hora y posteriormente disminuyo. Sin embargo para *bfpT*, los niveles de RNAm se mantuvieron constantes aún después de ocho horas.

El efecto del crecimiento en LB sobre la expresión de las fusiones *bfpA-cat* y *bfpT-cat* fue analizado, creciendo las cepas B171-8/pCAT232 y B171-8/pUST166 a 37°C en medio LB. Interesantemente, el crecimiento en medio LB también reprime la expresión de *bfpT*, reduciéndola a 13% de la actividad de CAT expresada en DMEM (Fig. 10).

Del mismo modo, la expresión de las fusiones *bfpA-cat* y *bfpT-cat* en EPEC, fue analizada en DMEM conteniendo 3, 6, 10, 15 y 20 mM de sulfato de amonio. La presencia de amonio en el medio de cultivo no alteró significativamente la cinética de crecimiento (dato no mostrado). La actividad de CAT en estas condiciones se redujo a 85, 74, 54, 23 y 10%, respectivamente, en relación a la actividad obtenida en ausencia de amonio (Fig. 11A). El análisis de la actividad de las fusiones *bfpA-cat* y *bfpT-cat* en EPEC creciendo en DMEM a diferentes temperaturas mostró que la expresión de *bfpT* también es afectada por este parámetro; el máximo de esa expresión ocurre a 37°C. A temperaturas entre 25°C y 29°C, la velocidad de crecimiento fue reducida significativamente (dato no mostrado), por lo que la actividad de CAT fue comparada de muestras de cultivo recolectadas a DO₆₀₀ de 1.2. El crecimiento en medio DMEM a 25, 29, 39, 40 y 41°C produce el 25, 45, 45, 22 y 10%, respectivamente, de la actividad de CAT expresada en DMEM a 37°C (Fig. 11B).

El efecto de estos parámetros fue confirmado por ensayos de extensión inversa con muestras de RNA total de la cepa EPEC B171-8/pUST166, obtenidas de cultivos a DO₆₀₀ de 0.6 en LB, DME suplementado con 15 mM sulfato de amonio a 37°C, DME a 39°C y DME a 29°C. Un oligonucleótido específico para *bfpT* fue empleado para la reacción de extensión inversa usando como molde RNAm de *bfpT* (Fig. 12A). La señal más débil observada en los carriles 2, 3, 4 y 5, se relaciona con los bajos niveles de actividad de CAT mostrada por la fusión *bfpT-cat* en la cepa EPEC B171-8/pUST166 crecida en LB, DME a 29°C y 39°C, y DME mas amonio a 37°C (ver Fig. 10 y 11A y B). Esto indica que la regulación de *bfpT*, observada a través de fusiones transcripcionales, es un reflejo del comportamiento que sigue la transcripción del gen silvestre.

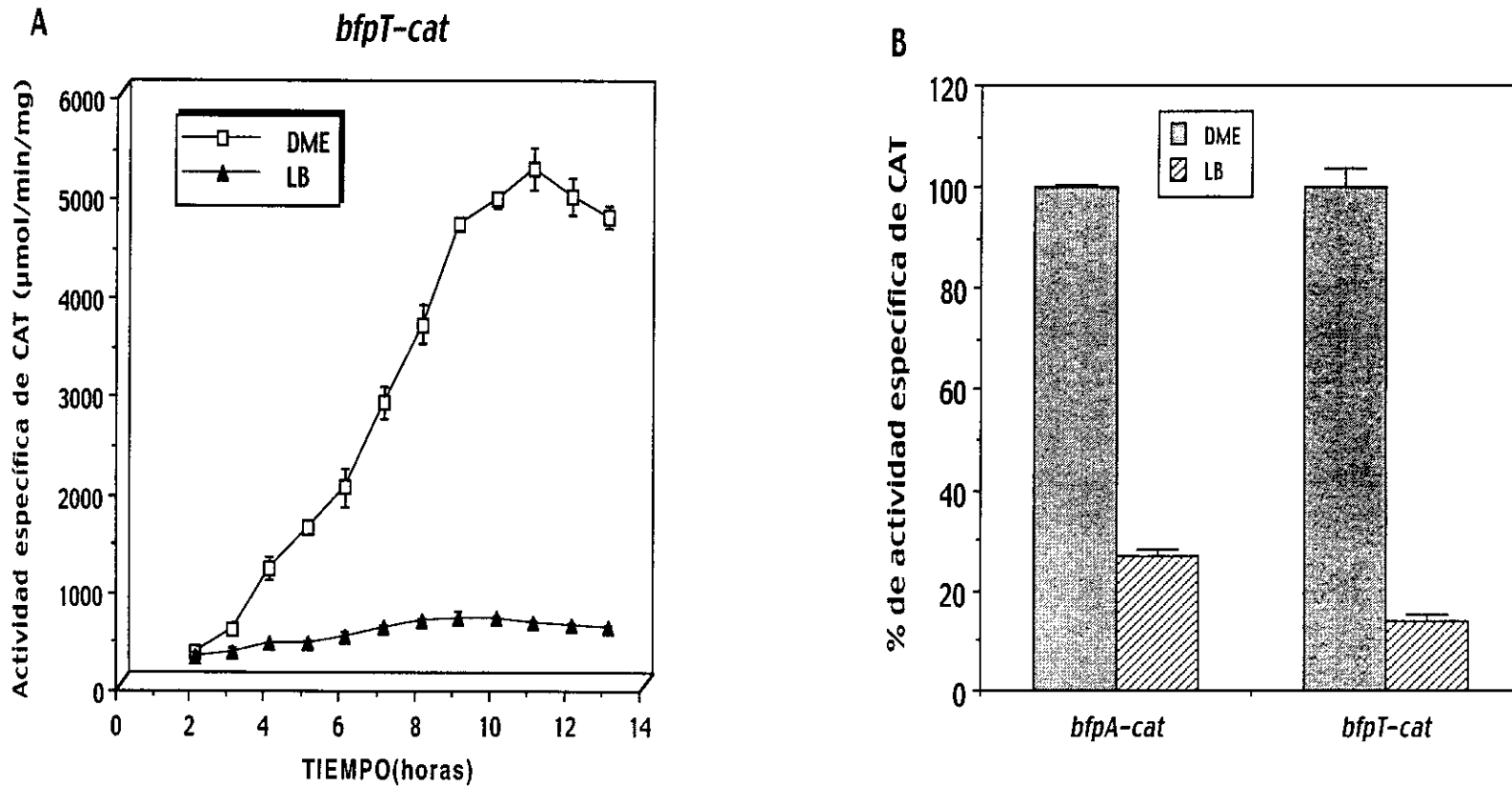


Fig. 10. La expresión de *bfpT* en EPEC B171-8 es afectada por el crecimiento en medio LB. (A) El efecto del crecimiento en medio LB sobre la expresión de *bfpT-cat* fue analizado creciendo las cepas B171-8/pCAT232 y B171-8/ pUST166 a 37°C en DME y LB. La actividad específica de CAT fue determinada de muestras de cultivo tomadas cada hora. Los valores corresponden al promedio de por lo menos tres experimentos diferentes. (B) La actividad específica de CAT expresada por las fusiones *bfpT-cat* y *bfpA-cat* en cada medio fue determinada en cultivos crecidos hasta $DO_{600} = 1.4$ y graficada como porcentaje de sus respectivas actividades específicas máximas en DME. Los valores corresponden al promedio de por lo menos tres experimentos diferentes.

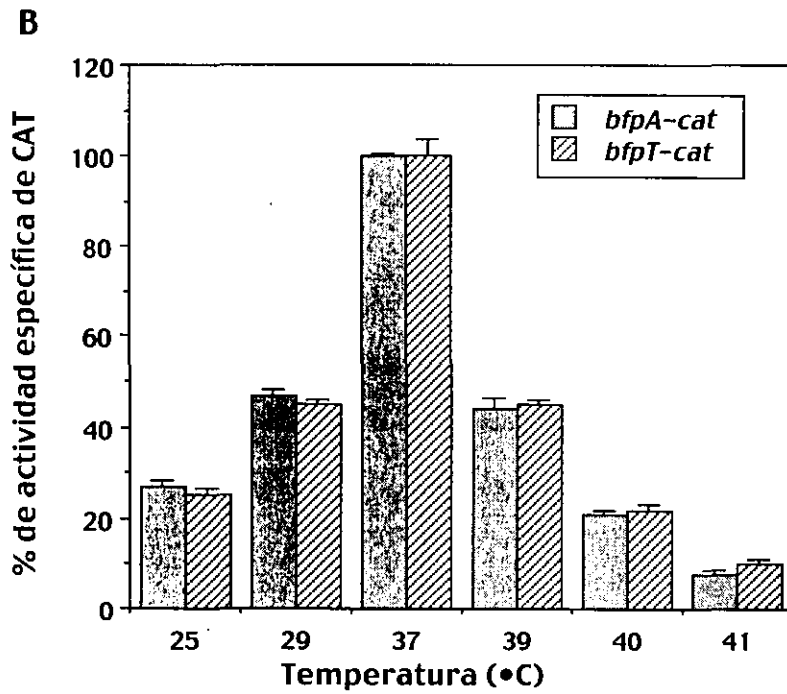
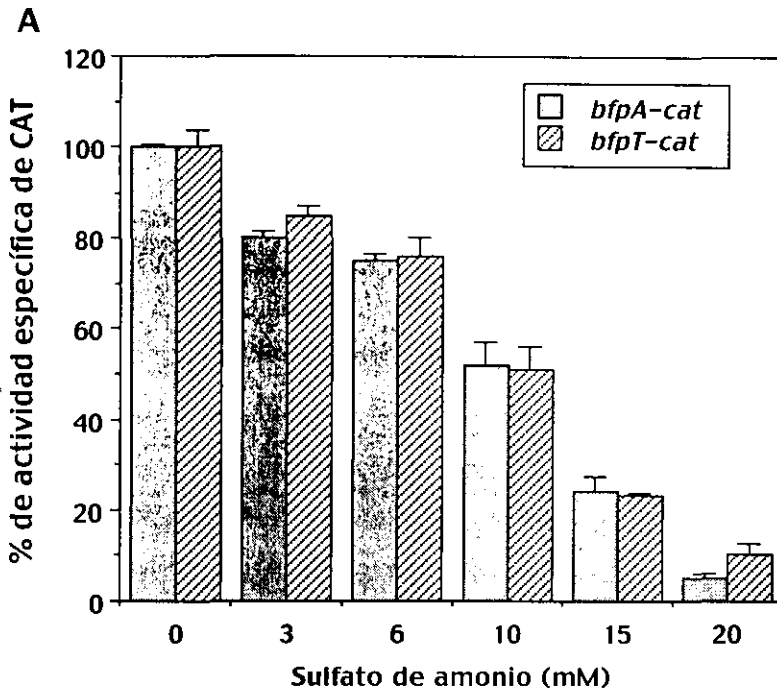


Fig. 11. Efecto del amonio y la temperatura sobre la expresión de *bfpT* y *bfpA*. (A) La expresión de *bfpT* y *bfpA* es reducida drásticamente por la adición de amonio al medio de cultivo. Las cepas B171-8/pCAT232 (fusión *bfpA-cat*) y B171-8/pUST166 (fusión *bfpT-cat*), fueron crecidas a 37°C en DME suplementado con concentraciones de sulfato de amonio que previamente habían mostrado reprimir la expresión of *bfpA* (Puente *et al.*, 1996). Las actividades específicas de CAT, obtenidas en cultivos a DO₆₀₀ de 1.4 en cada concentración de sulfato de amonio, son graficadas como porcentaje de la actividad de cada fusión en ausencia de amonio. La presencia de amonio en el medio de cultivo no altera de manera significativa la cinética de crecimiento (datos no mostrados). Los valores corresponden al promedio de por lo menos tres experimentos diferentes.

(B) El máximo de expresión de *bfpT* y *bfpA* ocurre a 37°C. Las cepas B171-8/pCAT232 (fusión *bfpA-cat*) y B171-8/pUST166 (fusión *bfpT-cat*), fueron crecidas en DME a las temperaturas indicadas. La actividad específica de CAT fue determinada de muestras de cultivo tomadas a DO₆₀₀ de 1.2 y 1.4. La actividad específica máxima de CAT obtenida en cada temperatura es representada como porcentaje de la actividad máxima de CAT observada para cada fusión a 37°C. Los valores corresponden al promedio de por lo menos tres experimentos diferentes.

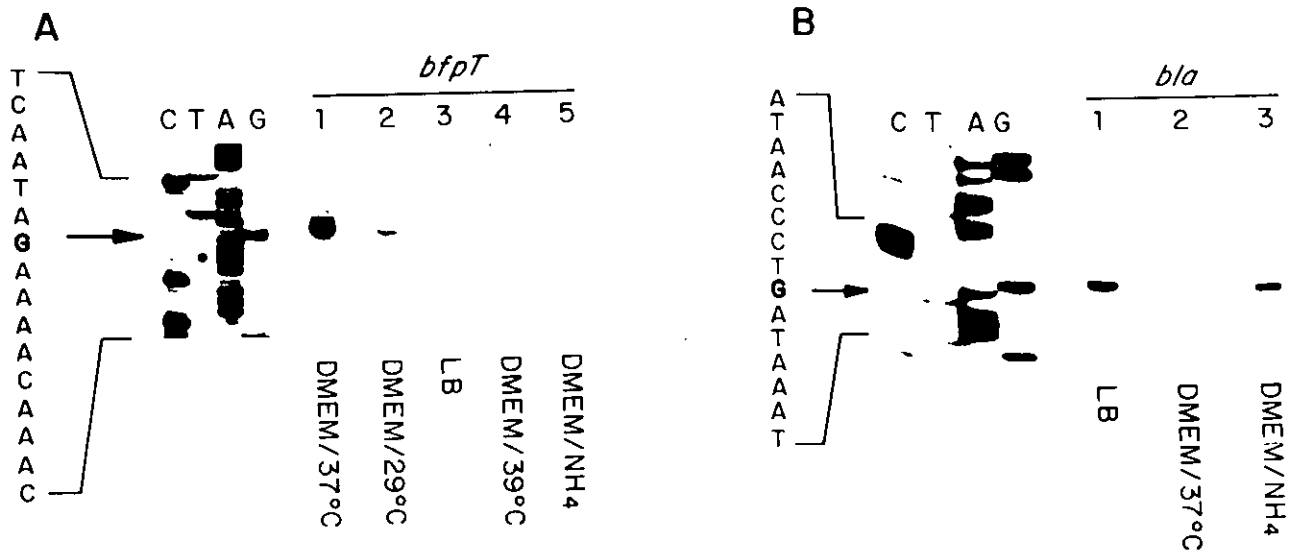


Fig. 12. Efecto del medio de cultivo, temperatura y la concentración de amonio sobre la transcripción de *bfpT*. RNA total fue extraído de muestras de cultivos, recolectadas a $DO_{600}=0.6$, de la cepa B171-8/pUST166 crecida en DME a 37°C (panel A, carril 1 y panel B, carril 2), DME a 29°C (panel A, carril 2), LB a 37°C (panel A, carril 3 y panel B, carril 1), DME a 39°C (panel A, carril 4) y DME con 15mM de sulfato de amonio a 37°C (panel A, carril 5 y panel B, carril 3). (A) Un oligonucleótido iniciador, marcado con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, específico para la región estructural de *bfpT*, fue utilizado para la reacción de extensión usando transcriptasa reversa y RNAm de *bfpT* como molde (15 μg de RNA total por reacción). La flecha indica el mismo sitio de inicio de la transcripción identificado para *bfpT*, sin embargo, los niveles del transcrito son diferentes (carriles 1 y 2, ver fig 4A).

(B) Un oligonucleótido iniciador específico para la región estructural del gen β -lactamasa (*bla*) (contenido en pKK232-8, vector de clonación utilizado para la construcción de las fusiones *bfpT-cat*), fue utilizado para la reacción de extensión usando transcriptasa reversa y RNAm de *bla* como molde (15 μg de RNA total por reacción). La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción de *bla*, sin embargo, presenta un perfil de expresión inverso al de *bfpT*.

Por otra parte, un oligonucleótido específico para la región codificante del gen de la β -lactamasa, *bla* (portado por pKK232-8, vector de clonación de las fusiones), fue empleado para realizar reacciones de extensión inversa usando como molde al RNA mensajero de *bla* presente en muestras de RNA obtenidas de cultivos en las condiciones descritas en la figura 12A. La expresión de *bla* mostró el patrón inverso de regulación (Fig. 12B), indicando que el perfil de expresión de *bfpT* en presencia de amonio o LB no es consecuencia de un efecto metabólico generalizado.

La regulación por amonio de *bfpA* and *bfpT* requiere de un factor específico de EPEC, mientras que la regulación por bajas temperaturas involucra un mecanismo global

Con el propósito de obtener evidencias que permitan evaluar si BfpT mismo u otra proteína reguladora es la que responde a la temperatura ambiental y a las concentraciones de amonio, la expresión de *bfpT* se mantuvo bajo el control del promotor *tac* permitiendo su expresión constante y no regulada. Lo anterior se demuestra por la presencia de niveles similares del transcrito de *bfpT* bajo condiciones de regulación en la cepa *E. coli* B171-10/pCS-T (Fig. 13B). Fue evaluado entonces el efecto negativo de la temperatura y la concentración de amonio sobre la transcripción de las fusiones *bfpA-cat* y *bfpT-cat* en la cepas EPEC B171-10 y *E. coli* K-12 (MC4100). *E. coli* B171-10 y *E. coli* MC4100 conteniendo el plásmido pCS-T fueron transformadas con los plásmidos pUST166 o pCAT232 y la actividad específica de CAT fue determinada en cultivos a DO₆₀₀ de 1.0, 1.2 y 1.4 en DME a 37°C, DME suplementado con 15 mM sulfato de amonio a 37°C y DME a 29°C. La figura 13A muestra que que el efecto represor del amonio sobre la expresión de *bfpT* y *bfpA* no es reproducible en el sistema no EPEC, independientemente del nivel de expresión del gen silvestre *bfpT* y de la concentración de amonio. Lo anterior indica que no hay regulación por el amonio en este fondo genético y que el amonio no modula directamente la actividad de BfpT. En contraste, la expresión de ambas fusiones en la cepa EPEC B171-10 (pEAF menos), fue reducida alrededor de un 80% (Fig. 13A), similar a lo observado en la cepa EPEC silvestre (B171-8) (ver Fig. 11A).

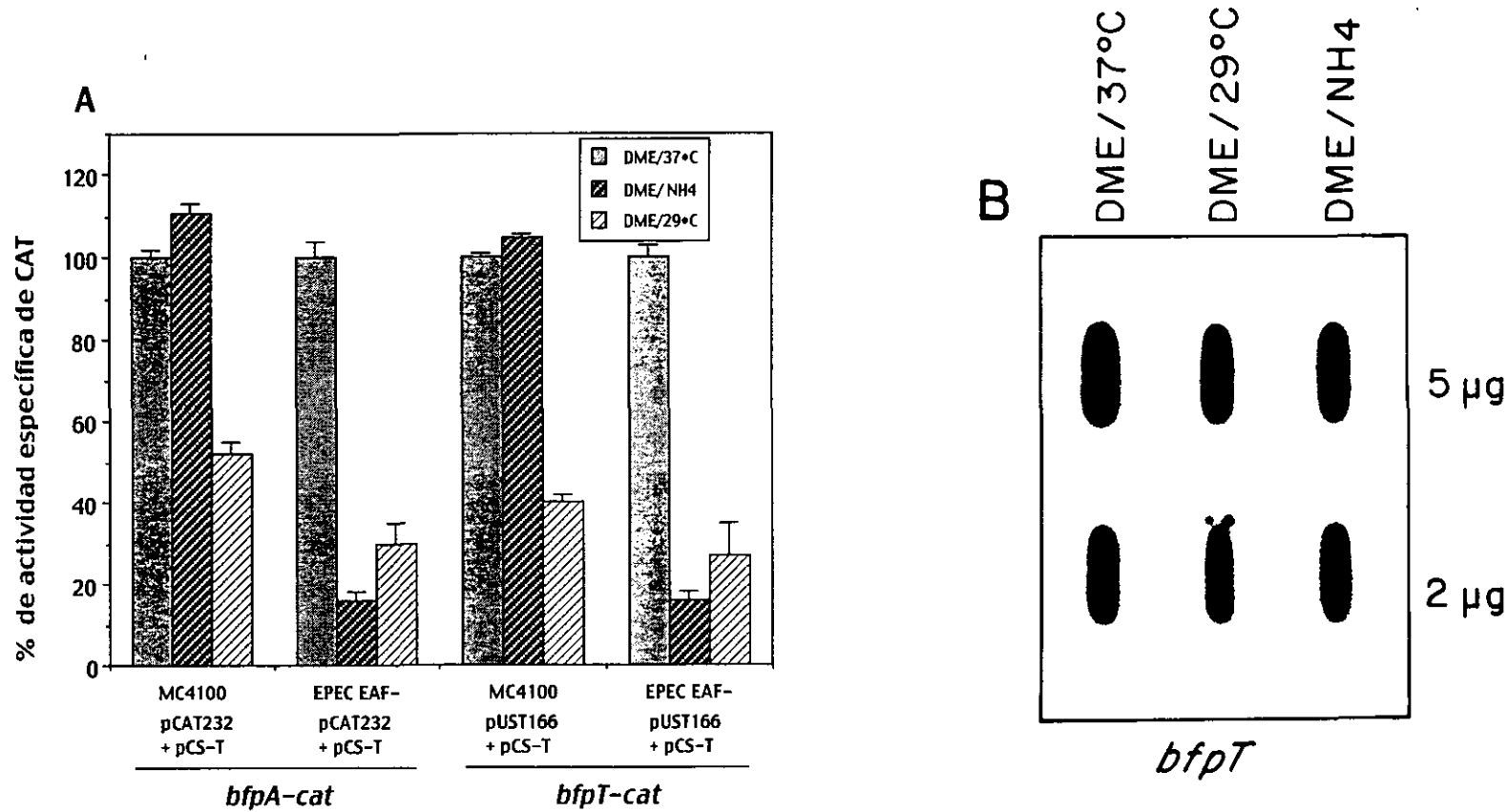


Fig. 13. La regulación de *bfpA* y *bfpT* por amonio, pero no por bajas temperaturas, requiere de un fondo genético de EPEC. (A) Las cepas EPEC B171-10, curada del plásmido EAF derivada de B171-8, y *E. coli* MC4100, conteniendo el plásmido pCS-T (derivado del pMPM-K3 portando el gen *bfpT*, el cual es transcrito a partir del promotor *tac*), fueron transformadas con pCAT232 (fusión *bfpA-cat*) o pUST166 (fusión *bfpT-cat*) y crecidas en DME a 29 y 37°C, y en DME con 15mM de sulfato de amonio a 37°C. La actividad específica de CAT para las fusiones *bfpA-cat* y *bfpT-cat* fue determinada en cultivos crecidos hasta DO600 de 1.0, 1.2 y 1.4.

(B) Para los ensayos de hibridación tipo "slot blot", en cada pozo de transferencia se cargaron 2 y 5 µg de RNA total aislado de la cepa B171-10/pCS-T + pUST166 crecida DME a 29 y 37°C, y en DME con 15mM de sulfato de amonio a 37°C. El RNA mensajero de *bfpT* se detectó usando una sonda de DNA específica a las regiones codificante de *bfpT*, marcada con [α -³²P]CTP. El nivel de transcrito de *bfpT* es similar en las diferentes condiciones indicando una expresión constante o no regulada.

Por otra parte, cuando las mismas cepas fueron crecidas en DME a 29°C, la expresión de ambos genes fue reducida tanto en EPEC B171-10 como en *E. coli* MC4100. Estos resultados implican que el efecto negativo sobre la actividad de BfpT o sobre la activación de los promotores de *bfpA* y *bfpT*, ejercida por la adición del amonio al DME, requiere de un factor codificado por el cromosoma de EPEC que actúa en *trans*; mientras que la regulación por bajas temperaturas involucra un mecanismo regulador global, común en *E. coli*.

Efecto de otros factores ambientales sobre la expresión de *bfpA* y *bfpT*.

Recientemente, ha sido mostrado que la secreción de EspB y otras proteínas secretadas de EPEC está sujeta a regulación por parámetros ambientales. La secreción requiere de concentraciones milimolares de hierro y es máxima a 37°C, a pH7 y a osmolaridad fisiológica (Kenny *et al*, 1997a). Dado que el locus *bfpTVW* (*perABC*) ha sido involucrado en la regulación del gen *eae* y *espB* (Gómez-Duarte y Kaper, 1995; Kenny y Finlay, 1995), planteamos en este proyecto analizar el efecto de estos factores sobre la expresión de los genes involucrados en la producción de la fimbria BFP. La cepa EPEC silvestre portando las fusiones de *bfpA-cat* y *bfpT-cat*, fue crecida hasta DO₆₀₀ de 1.2 en DMEM a 37°C, bajo diferentes condiciones de osmolaridad y concentraciones de hierro. Los niveles de actividad de CAT expresada por las fusiones, en condiciones de bajo hierro (<< 0.25 µM) producidas por la adición de quelantes o en concentraciones entre 0.25 y 1 mM de FeCl₃, fueron similares a las observadas bajo las condiciones de máxima expresión (DME con 0.11 M NaCl, 0.25 µM Fe, pH 7.5 a 37°C). Por otra parte, cuando las cepas fueron crecidas en concentraciones crecientes de NaCl, aumentando con esto la osmolaridad del medio, la actividad de CAT expresada por ambas fusiones se incrementó de manera significativa sobre los niveles que se muestran en baja osmolaridad (Tabla 3)

Para examinar el efecto del pH sobre la expresión de los genes *bfp*, fue utilizado DME adicionado con 0.1M de MOPS y ajustado a diferentes pH con NaOH o HCl. Debido a que el aumento de la osmolaridad y el cambio de pH en el medio, por arriba o debajo de 7.5, alteró la cinética de crecimiento, las muestras de cultivo en las diferentes condiciones

fueron recolectadas a $DO_{600}=1.2$. La expresión de los genes *bfp* no responde a cambios de pH; sin embargo, la actividad de ambas fusiones fue dos veces mayor en DME+MOPS comparado con DME pH 7.5 sin MOPS, aparentemente debido a efectos osmóticos (Tabla 3). Estos resultados indican que la expresión de los factores de virulencia en EPEC no necesariamente sigue el mismo patrón de regulación, o que la secreción de proteínas es afectada por algunas de las condiciones de crecimiento.

TABLA 3

Regulación de *bfpT* y *bfpA* en Respuesta a Osmolaridad, pH y Fierro

Condiciones de Crecimiento	Actividad específica de CAT ^a :			
	<i>bfpT:cat</i>	Cociente ^c	<i>bfpA:cat</i>	Cociente
0.11M NaCl ^d 0.25µM Fe pH 7.5	3027 ± 6	1.0	5575 ± 48	1.0
Bajo Fierro ^e	2733 ±151	0.9	5714 ± 258	1.0
0.25mM Fe	2744 ± 186	0.9	5514 ± 94	1.0
1 mM Fe	2650 ± 158	0.9	6276 ± 203	1.1
0.2M NaCl	5127 ± 151	1.7	10620 ± 235	1.9
0.3M NaCl	5851 ± 732	1.9	12949 ± 214	2.3
0.4M NaCl	6259 ± 280	2.1	12667 ± 833	2.3
MOPS ^f , pH 6.0	6126 ± 343	2.0	15318 ± 1227	2.7
MOPS, pH 6.5	6064 ± 722	2.0	15899 ± 617	2.9
MOPS, pH 7.0	5507 ± 194	1.8	14292 ± 410	2.6
MOPS, pH 7.5	5780 ± 280	1.9	15861 ± 594	2.8
MOPS, pH 8.0	5273 ± 71	1.8	14622 ± 170	2.6

a. Actividad específica de CAT fue determinada de muestras de la cepa EPEC B171-8, tomadas cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de 1.2.

b. Promedios y desviación estándar son a partir de tres experimentos.

c. Relación de la actividad específica de *bfpT:cat* o *bfpA:cat* en una condición particular de crecimiento a la actividad específica en la condición estandar de crecimiento.

d. Condiciones estandares para DMEM.

e. Medio con bajo fierro consistió de DME conteniendo 125 µM 2,2,dipyridyl.

f. 0.1 M MOPS se añadió al DME y el pH se ajustó con NaOH o HCl.

DISCUSION

La fimbria BFP (“bundle-forming pili”) es un determinante de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) cuya expresión responde a señales ambientales características del intestino delgado y se requiere para la producción de diarrea (Girón *et al.*, 1991; Ramer *et al.*, 1996; Puente *et al.*, 1996; Bieber *et al.*, 1998). La producción de BFP inicia durante la fase exponencial y es modulada por la concentración de amonio, el medio de cultivo y la temperatura (Puente *et al.*, 1996).

La expresión de *bfpA*, el gen estructural de BFP, es regulada principalmente a nivel transcripcional y requiere del producto del gen *bfpT* (también llamado *perA*), un activador transcripcional de la familia XylS-AraC (Gómez-Duarte y Kaper, 1995; Tobe *et al.*, 1996). La inactivación de *bfpT* conduce a la pérdida de la transcripción de *bfpA*, la producción de BfpA y de los fenotipos de adherencia localizada y autoagregación; estos fenotipos mutantes pueden ser complementados por la introducción del locus *bfpTVW* (Tobe *et al.*, 1996, Bieber *et al.*, 1998). El locus *bfpTVW* (*perABC*) localizado en el plásmido EAF, está organizado como un operón de tres genes (Sosa-Macias, datos no publicados, Sanchez-SanMartin *et al.*, 1999). Se ha sugerido que está involucrado en la expresión de *eae* y *espA* (Gómez-Duarte y Kaper, 1995; Kenny y Finlay, 1995). Sin embargo, recientemente ha sido mostrado que el operón *bfpTVW* no tiene efectos significativos sobre la expresión de genes en la región LEE, tales como el operón *tir-cesT-eae* y los genes *sepZ*, *escV* y *sepL* (Sanchez-SanMartin *et al.*, 1999, Bustamante *et al.*, datos no publicados).

Con la finalidad de determinar los mecanismos involucrados en la expresión de BFP en respuesta a señales ambientales, en este trabajo describimos la regulación transcripcional de *bfpT*, el gen que codifica para BfpT, el regulador positivo de la fimbria BFP en EPEC.

Dado que en estudios previos (Puente *et al.*, 1996) se mostró que la expresión del sistema reportero CAT por fusiones transcripcionales *bfpA-cat* refleja los niveles de expresión del RNAm de *bfpA*, realizamos los estudios de la expresión de *bfpT* usando fusiones transcripcionales *bfpT-cat*. El análisis por eliminación de nucleótidos de la

región corriente arriba” de *bfpT*, usando fusiones génicas, indicó que los nucleótidos hasta la posición -81, respecto al sitio de inicio de la transcripción, fueron requeridos para la activación total del promotor de *bfpT* (Fig. 3 y 5). Cuando se removió la secuencia hacia arriba de -66 y -54, sólo se obtuvo el 10 y 4% de la actividad total, respectivamente (Fig. 3). Estos resultados indican que la activación de la transcripción de *bfpT* requiere de una secuencia “corriente arriba” que se extiende por lo menos de -81 a -54, y sugiere que esta región contiene los elementos *in cis*, incluyendo el promotor, de los que depende la transcripción de *bfpT* (Fig. 5).

Por ensayos de extensión inversa (Fig. 4), identificamos el extremo 5' del RNAm de *bfpT* y *bfpT-cat*: el promotor de *bfpT* podría corresponder a un hexámero -35 (TTGATT) y a un hexámero -10 (AAAAAT) separado por 17 nucleótidos y localizado 5 bp hacia arriba del sitio de inicio de la transcripción (Fig. 4 y 5), sugiriendo que *bfpT* es transcrito por un promotor convencional dependiente de sigma-70 (Hawley y McClure, 1983). La secuencia hacia arriba del promotor de *bfpT* contiene un trecho rico en A-T, el cual muestra secuencias repetidas invertidas. Una secuencia homóloga está involucrada en la regulación de *bfpA* dependiente de BfpT (Bustamante *et al.*, 1998; Fig. 7). Secuencias de este tipo han sido frecuentemente involucradas en el control, por ejemplo, de promotores regulados positivamente por Rns (Froehlich, 1994; Murphree *et al.*, 1997) y CfaD (Savelkoul *et al.*, 1990; Jordi *et al.*, 1994) en *E. coli* enterotoxigénica; ToxT (Higgins y DiRita, 1994; Brown y Taylor, 1995) en *V. cholerae*; VirF (Jost y Adler, 1993; Tobe *et al.*, 1993) en *Shigellae flexneri*, todos ellos miembros de la familia XylS/AraC.

Por otra parte, regiones compuestas de residuos continuos de A-T, tales como el bloque rico en A-T de 29 residuos entre las posiciones -26 y -65 (Fig. 5), han sido involucrados como elementos localizados hacia arriba de la región -35, la cual hace contacto con la subunidad alfa de la RNA polimerasa (Ross *et al.*, 1993). Además regiones ricas en A-T, corriente arriba de los genes *pilA* de *P. aeruginosa* y *pilE* de *N. gonorrhoeae*, son requeridos para la máxima transcripción actuando como elementos UP (Ishimoto y Lory, 1989; Fyfe y Davies, 1998). Sin embargo, la posible interacción de BfpT con la RNA polimerasa aún tiene que ser investigada.

El análisis de la actividad de la fusión *bfpT-cat*, en una cepa mutante en *bfpT*, y experimentos de complementación en cepas EPEC EAF menos y no EPEC, reveló que la transcripción de *bfpT* requiere de una proteína BfpT funcional, sugiriendo así un mecanismo autorregulador. Varios activadores transcripcionales regulan positivamente su propia expresión, entre ellos, *luxR* (Shadel y Baldwin, 1992), *papB* (Forsman *et al.*, 1989), *crp* (Hanumura y Aiba, 1992), *bvgA* (Roy *et al.*, 1990), *hrpB* (Genin *et al.*, 1992), *rns* (Froehlich *et al.*, 1994), *toxT* (Brown y Taylor, 1995; Champion *et al.*, 1997), *ureR* (D'Orazio y Collins, 1995) y *marA* (Martin *et al.*, 1996). Al igual que BfpT, los reguladores HrpB, Rns, ToxT, UreR y MarA son miembros de la familia XylS/AraC de activadores transcripcionales.

El hecho de que el producto del gen *bfpT* estimula su propia expresión, sugiere la existencia de un circuito autorregulador en la transcripción de los operones *bfpTVW*. La expresión continua de *bfpT* durante la curva de crecimiento, asegura niveles de la proteína BfpT a fin de que la inducción de *bfpA* ocurra cuando las señales ambientales apropiadas estén disponibles (Fig. 8A y 9).

El promotor de *bfpT* es activado por BfpT y, al igual que la secuencia de la región -10 del promotor de *bfpA* (GATTAT) (Bustamante *et al.*, 1998), la región -10 del promotor de *bfpT* (AAAAAT) muestra características de promotores regulados positivamente (Fig. 5). El efecto autorregulador positivo puede ser debido a la unión directa de BfpT sobre el promotor de *bfpT*. Hacia arriba de este presunto promotor, un trecho de 46 nucleótidos ricos en A-T muestra 71 % de identidad con una región necesaria para la regulación de *bfpA* dependiente de BfpT (Bustamante *et al.*, 1998) y para la aparente unión estable de BfpT al DNA, (Tobe *et al.*, 1996). Esto sugiere que las regiones reguladoras de *bfpA* y *bfpT* contienen elementos comunes los cuales, en *bfpT*, pueden contribuir a la activación transcripcional proporcionando el sitio de unión para BfpT en el mecanismo autorregulador (ver Fig. 7). Interesantemente, los residuos del extremo 3' de la región homóloga están localizados en la posición -26 en la región reguladora de *bfpT*, translapando a la secuencia -35 del promotor. En contraste, en *bfpA*, la misma región está localizada en la posición -40, hacia arriba del promotor (Fig. 7). Si esta región determina la unión de BfpT, esto sugiere que este regulador puede

activar a partir de diferentes posiciones. Adicionalmente, el alineamiento mostrado en la Fig. 7 también reveló que la actividad de CAT de una fusión con un recorte en la secuencia hacia abajo, en la posición -66 del *bfpTp*, la cual aún incluye la región homóloga completa, fue drásticamente afectado. En contraste, una remoción similar en *bfpA* (pCAT85) retuvo su actividad (Bustamante *et al.*, 1998).

La comparación de la secuencia ausente en las fusión *bfpT-cat* del plásmido pUST66, con respecto a la contenida en el pUST81, y aquella que falta en las fusiones *bfpA-cat* del plásmido pCAT77, con respecto a la del pCAT85 (Bustamante *et al.*, 1998), mostró que la secuencia GAAAAATAT (posiciones -75 a -67) en *bfpT*, es casi idéntica a la secuencia GAAATATAT (posiciones -83 a -75) en *bfpA* (Fig. 7). Esta observación sugiere que esta región es importante en la activación del gen, dado que hay diferencias significativas en la actividad entre cada par de plásmidos (Fig. 3; Bustamante *et al.*, 1998). Alternativamente, el resto de la región homóloga puede ser reconocida por otros factores, como por ejemplo aquellos involucrados en la regulación negativa por amonio, temperatura o el crecimiento en medio LB. El significado de estas observaciones en la interacción de BfpT con las regiones reguladoras de *bfpA* y *bfpT* y la actividad del promotor, está siendo investigado. A este respecto, la definición detallada del sitio de unión de BfpT por ensayos de "footprinting", o ensayos de retardamiento, no ha tenido el éxito esperado dado que la sobreexpresión y purificación de esta proteína han sido particularmente difíciles (Tobe *et al.*, 1996; Bustamante *et al.*, 1998).

La transcripción de *bfpA* ocurre principalmente durante la fase exponencial de crecimiento, y la magnitud de la acumulación del RNAm de *bfpA* y de la proteína BfpA correlaciona positivamente con la duración de esta fase de crecimiento (Puente *et al.*, 1996). En otros patógenos bacterianos, pocos genes han sido descritos cuya expresión es apagada en la fase estacionaria (Lebeau *et al.*, 1994; McIver y Scott, 1997). En su mayoría, genes asociados a virulencia son activados cuando las células entran a la fase estacionaria y los nutrientes son limitados. En contraste a *bfpA*, la fase de crecimiento no afecta la expresión de *bfpT*. A partir de los estudios del reportero CAT y la detección del transcrito de *bfpT* por ensayos de "slot blot" (Fig.8A y 9), es claro que la expresión máxima de *bfpT* se alcanza entre la fase exponencial

tardía y la fase estacionaria temprana. Solo los niveles de RNAm de *bfpA* fueron directamente controlados durante el crecimiento. Para *bfpT*, nuestros datos sugieren que el encendido del promotor es controlado por la fase de crecimiento como un promotor restringido asociado con RNA polimerasa dependiente de sigma-70, el cual es dependiente de la velocidad de crecimiento y viene a ser más activo a altas velocidades de crecimiento (Vicente, 1991). Adicionalmente, un represor sintetizado predominantemente en fase estacionaria parece ser necesario para apagar la transcripción de *bfpA*. Este represor hipotético puede ser dependiente de la producción del factor sigma de fase estacionaria, RpoS (Loewen y Hengge-Aronis, 1994) y podría actuar sobre o hacia arriba del promotor de *bfpA*, interfiriendo con la actividad o con la unión de BfpT. Esto podría ser investigado analizando la expresión de *bfpA* durante las fases exponencial y estacionaria de crecimiento en una mutante en *rpoS*.

Dado que la expresión de los genes *bfp* es regulada por el crecimiento en medio LB y la concentración de amonio (Puente *et al.*, 1996; Fig. 10, 11 y 12), sugerimos que un factor regulador negativo interactúa con las regiones "corriente arriba" de los genes *bfpA* y *bfpT* para reprimir la transcripción en presencia de amonio o LB. El regulador negativo por amonio puede ser un represor específico en EPEC, como lo muestra la ausencia de regulación a esta señal en el fondo genético no-EPEC (Fig. 13). Interesantemente, ha sido previamente propuesto que tales señales específicas podrían determinar el sitio inicial de colonización intestinal por EPEC y ETEC (Puente *et al.*, 1996; Edwards y Schifferli, 1997, Edwards y Puente, 1998). Los mecanismos específicos por los cuales los genes *bfp* son regulados en respuesta al crecimiento en medio LB y a la concentración de amonio están siendo investigados actualmente.

La regulación por temperatura parece ser una característica común en la expresión de las propiedades bacterianas asociadas a virulencia (Maurelli, 1989). La transición del ambiente de baja temperatura a la temperatura corporal, ha sido correlacionada con cambios dramáticos en la expresión de los determinantes de virulencia en varios organismos (Mekalanos, 1992). Varios de los determinantes de virulencia son regulados por proteínas de la familia XylS/AraC y no son expresados a bajas temperaturas, pero en la mayoría de los casos el mecanismo para la

termorregulación no ha sido identificado (Tabla 2). La expresión de genes que codifican para ciertos pilis y factores de virulencia es termorregulada; son expresados a 37°C pero no a 26 o 30°C (Jordi *et al.*, 1992; Nataro *et al.*, 1994; Tobe *et al.*, 1993, Murphree *et al.*, 1997; Edwards y Schifferli, 1997, Tabla 2). En la mayoría de estos sistemas tanto los genes blanco como los reguladores transcripcionales positivos son termorregulados y reprimidos por H-NS (Histone-like nucleoid structuring protein), un regulador global de genes de virulencia y metabolismo en *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* (Atlung e Ingmer, 1997). Varios de los genes modulados por H-NS son regulados por señales ambientales y la expresión de la mayoría de estos genes es regulada de manera positiva por factores de transcripción específicos. Este fenómeno, el cual se ha visto es común en la regulación de factores de virulencia bacterianos, ha sido revisado en detalle por Mekalanos (1992) y por Atlung e Ingmer (1997).

Al igual que los sistemas fimbriales CFA/I, AAF/I y 987P (Jordi *et al.*, 1992; Nataro *et al.*, 1994; Edwards y Schifferli, 1997), la transcripción de los genes *bfpA* y *bfpT* también exhibe dependencia a la temperatura: a 29°C y 39°C ambos genes son reprimidos (Fig.11B). Aun en condiciones donde la expresión de BfpT no se regula y es constante (Fig. 13B), a 29°C la expresión de los genes *bfpA* y *bfpT*, independientemente del fondo genético de *E. coli*, resultó disminuida (Fig. 13A). Así, asumimos que de alguna manera, H-NS está involucrado en esta regulación bloqueando la transcripción de los promotores de *bfpA* y *bfpT*.

Dado que la temperatura, medio de cultivo y concentración de amonio modulan a nivel transcripcional la expresión de *bfpT* y que BfpT regula la expresión de *bfpA*, sugerimos que, por lo menos en parte, la expresión de *bfpA* es controlada por los niveles de BfpT en la célula. Aun así, es difícil evaluar si BfpT mismo u otra proteína reguladora que responde a la temperatura ambiental y a concentraciones de amonio, o un factor presente en LB interactúa directamente con BfpT para reducir su afinidad por el DNA. Alternativamente, las regiones promotoras de *bfpA* y *bfpT* también pueden ser afectadas por otros reguladores en adición a BfpT. Por lo tanto, en condiciones donde la expresión de *bfpT* estuvo bajo el control del promotor *tac*, analizamos el efecto negativo de la temperatura, medio de cultivo y la concentración de amonio sobre la

transcripción de las fusiones *bfpA-cat* y *bfpT-cat*, usando la cepa B171-10 (plásmido EAF menos) y una cepa *E. coli* K-12 (MC4100).

Interesantemente, nuestros estudios fueron indicativos de que la represión por amonio fue ejercida por un elemento que actúa en *trans* y que sólo está presente o es funcional en EPEC, dado que la regulación por amonio no fue observada en un fondo no EPEC (Fig. 13A). No sabemos si este presunto regulador negativo controla la transcripción de *bfpT* y *bfpA* por unión directa a sus regiones reguladoras, o por interacción con BfpT. Este estudio también se está llevando a cabo en el laboratorio. La regulación de factores de virulencia en bacterias entéricas por amonio no ha sido extensamente estudiada; sin embargo, se ha sugerido que existe un gradiente de concentración de amonio a lo largo del tracto intestinal, que puede influenciar la expresión de factores de virulencia. Así, la aparente colonización preferencial del intestino delgado proximal por EPEC, podría estar correlacionada con la concentración de amonio más baja en esta región (Puente *et al.*, 1996; Edwards y Puente, 1998). En contraste, ETEC porcina coloniza preferencialmente el intestino delgado distal, correlacionando con el hecho de que la fimbria 987P es regulada positivamente por amonio (Edwards y Schifferli, 1997). De esta forma, la regulación por el medio de cultivo y por amonio de la expresión de los genes *bfp* probablemente ocurre sobre los promotores de *bfpA* y *bfpT*, y requiere de factores reguladores específicos de EPEC, mientras que la regulación por bajas temperaturas parece ser modulada por un factor global tal como H-NS.

Recientemente, Kenny *et al.* (1997), reportaron que la exportación de determinantes de virulencia, como las proteínas secretadas de EPEC (proteínas Esp), es afectada por las condiciones ambientales de crecimiento. La secreción es máxima a 37°C, pH7 y osmolaridad fisiológica, y requiere de concentraciones milimolares de Hierro. En suma, estos autores muestran que varias de las condiciones, que han sido previamente descritas como necesarias para inducir la expresión de *bfpA* (Puente *et al.*, 1996), también inducen la secreción de proteínas de EPEC. Además, las condiciones de crecimiento que reprimen la expresión de BFP, tales como amonio, temperatura y medio LB, también tienen un efecto negativo sobre la secreción de las proteínas Esp en EPEC. A este respecto, nuestros resultados muestran que el pH del

medio de cultivo o el Hierro, aun en concentraciones milimolares, no afecta la expresión de *bfpA* y *bfpT* (Tabla 3). Además, la expresión transcripcional de *bfpA* y *bfpT* fue incrementada por condiciones de aumento en la osmolaridad, indicando que la expresión de los genes *bfp* y el operón *bfpTVW* no muestran el mismo perfil de regulación dependiente de las señales ambientales como el de la secreción de proteínas. Es posible que la osmolaridad ejerza su efecto sobre la secreción de proteínas por cambios sobre la permeabilidad de la membrana.

De esta manera, sugerimos que el efecto que los parámetros ambientales, tales como la concentración de Hierro, osmolaridad y pH, muestran sobre la secreción de las proteínas Esp en EPEC, no está relacionado a la influencia que tienen sobre la expresión del operón *bfpTVW*, o sobre la actividad reguladora de BfpT. Aún permanece la posibilidad de que un factor regulador adicional, asociado a virulencia, intervenga en respuesta a los estímulos externos que regulan la secreción de proteínas; o que la secreción es regulada por el control, a nivel transcripcional, de la expresión de los genes que codifican el aparato de secreción tipo III de EPEC (Fig. 14). Un candidato para realizar esa función es el regulador Ler (LEE encode regulator), el cual se ha involucrado en la expresión de por lo menos cuatro operones que codifican para componentes del sistema de secreción tipo III, proteínas secretables, la intimina y su receptor Tir (Mellies *et al.*, 1999, Fig 14).

En resumen, los resultados presentados en este estudio y otros previos (Puente *et al.*, 1996; Ramer *et al.*, 1996) indican que en EPEC O111:NM (cepa B171), la expresión del operón *bfpTVW* (*perABC*) no es afectada por la fase de crecimiento; sin embargo, es regulado por algunas de las mismas señales ambientales que afectan la expresión de la subunidad BfpA del pili BFP y la lipoproteína BfpB, sugiriendo que la regulación del operón *bfp* en respuesta a señales ambientales, es por lo menos en parte, dependiente de los niveles celulares de BfpT,. Además, nuestros resultados sugieren que *bfpT* ejerce su efecto sobre la expresión de BFP actuando como un regulador positivo de la transcripción de su propio gen y de los genes fimbriales *bfp*. Por otra parte, los experimentos de complementación realizados en la cepa EPEC carente del plásmido EAF (B171-10), también indican que la expresión de *bfpA* y *bfpT*

es modulada por la influencia de parámetros ambientales y de factores reguladores aún no identificados que interactúan sobre su región reguladora, y/o indirectamente sobre la actividad reguladora de BfpT (Fig.14).

Estos datos, podrían ser un indicativo de lo que sucede *in vivo* durante la infección, donde la expresión regulada de BFP proporcionaría el mecanismo que ayudara a la determinación del sitio inicial de unión de este patógeno entérico en el tracto gastrointestinal (Fig. 15). Usando su conjunto de fimbrias, los diferentes patógenos entéricos son capaces de adherirse en diferentes regiones durante su viaje a lo largo del tracto intestinal. Las bacterias entéricas se enfrentan a una combinación compleja de señales fisicoquímicas variables, tales como temperatura, pH, osmolaridad, disposición de nutrientes y presencia de sustancias tóxicas. La combinación de estas señales ambientales, podría proporcionar a la bacteria un mapa de viaje intestinal, para identificar su nicho apropiado y estimular la expresión de genes fimbriales. Esto aseguraría la adherencia en el compartimento apropiado del hospedero, en el tiempo correcto (Edwards y Puente, 1998).

Los gradientes de nutrientes probablemente proporcionan este tipo de señales a las bacterias intestinales. Por ejemplo, la glucosa de la dieta es absorbida rápidamente en la parte superior del intestino de todos los mamíferos. Muchos operones fimbriales son regulados en respuesta a glucosa, lo cual confirma la noción de que este nutriente podría ser usado como un indicador de nicho (Fig. 15). En este sentido, se ha visto que la expresión tanto del BFP de EPEC y TCP de *V. cholerae* es aumentada por el crecimiento en fuentes de carbono, tales como glucosa (Puente *et al.*, 1996; Skorupski y Taylor, 1997).

Un mejor entendimiento de los mecanismos reguladores que controlan la expresión de los factores de virulencia en EPEC, nos permitirá entender mejor el proceso por el cual se establece una infección y cómo las señales encontradas en el hospedero conducen a una apropiada expresión espacio-temporal de los diferentes factores de virulencia.

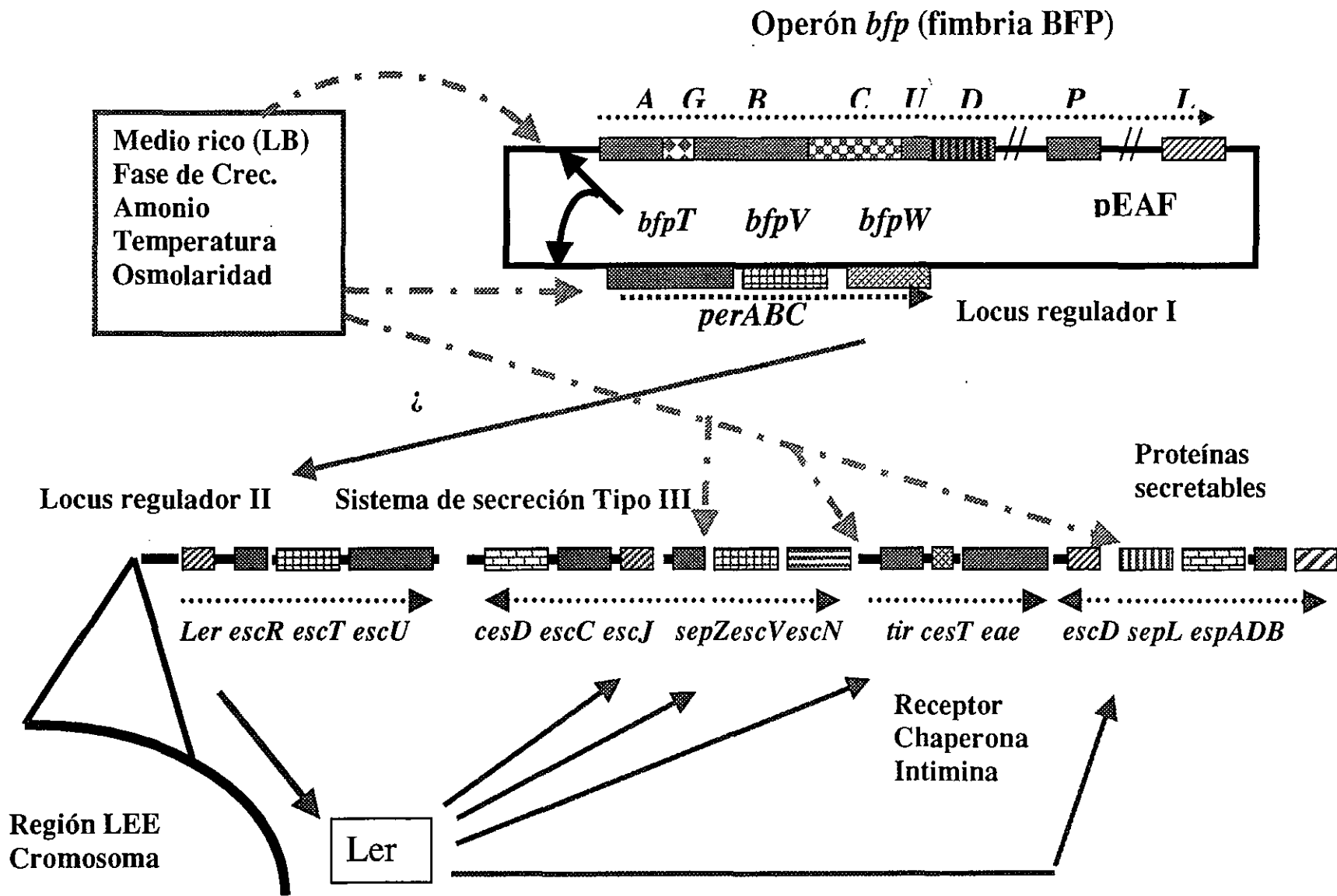


Fig. 14. Representación esquemática de la red reguladora en la expresión de los factores de virulencia de EPEC. El plásmido EAF es representado por un rectángulo que incluye el operón de genes involucrado en la biosíntesis de la fimbria BFP y el operón *bfpTVW* (*perABC*) (locus regulador I). La región LEE en el cromosoma codifica para genes involucrados en la patogénesis de EPEC que incluye intimina, su receptor Tir, proteínas secretables, el sistema de secreción tipo III y el regulador Ler (locus regulador II). Las flechas gruesas indican el efecto positivo de los loci reguladores (I y II) sobre la expresión de los determinantes de virulencia de EPEC. Las flechas punteadas indican la presunta organización transcripcional de los diferentes grupos de genes. Encerrados en cuadro se indican los factores ambientales involucrados en esta red y las flechas discontinuas indican sobre que loci tienen efectos.

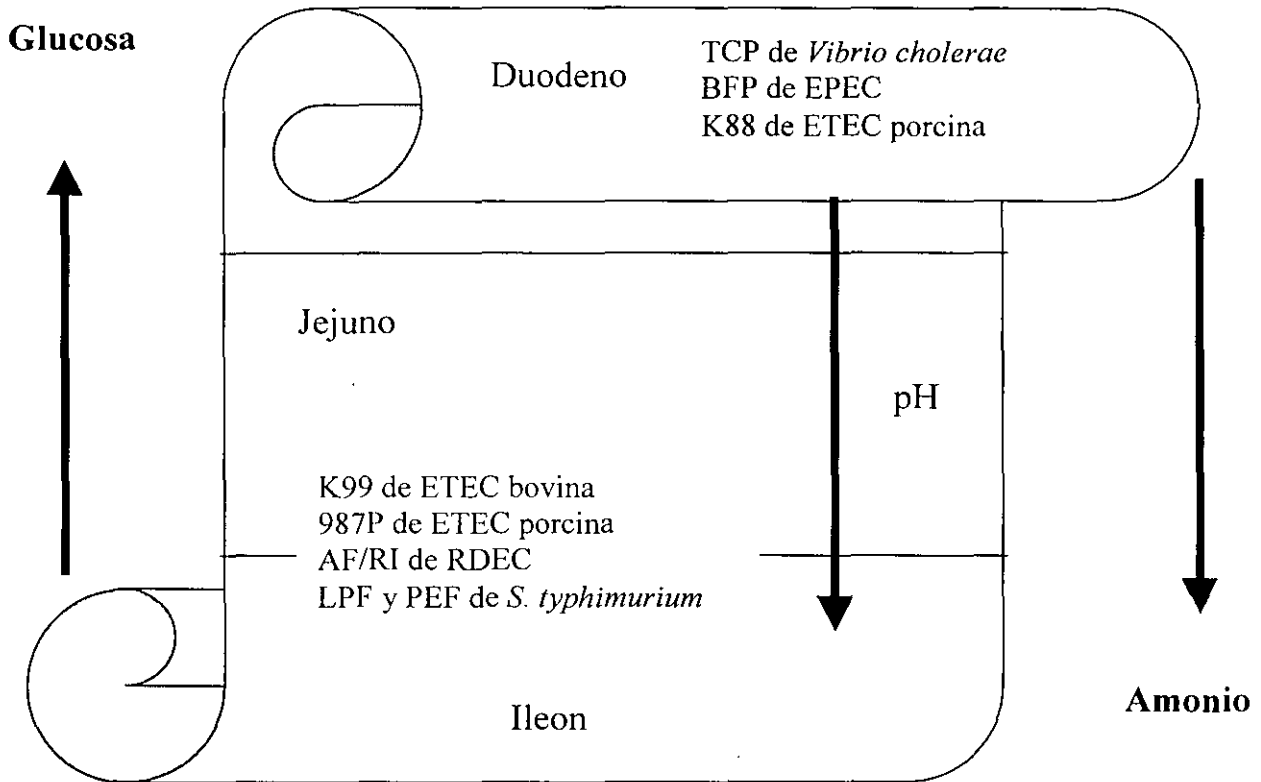


Fig. 15. Modelo de regulación de la expresión de fimbrias de bacterias enteropatógenas por factores ambientales en el intestino. La dirección de la flecha indica el gradiente ascendente del nutriente o la señal ambiental. El sitio preferido de unión bacteriana, correlaciona con el efecto inductor o represor del gradiente de la señal ambiental sobre la expresión de la fimbria.

CONCLUSIONES

I) La región reguladora de *bfpT* reside en un fragmento de 81 nucleótidos que posee las secuencias necesarias para su expresión y regulación, incluyendo el presunto promotor dependiente de sigma-70 entre los nucleótidos -33 y -61, respecto al codón de inicio de la traducción.

II) La transcripción de *bfpT* inicia en una G, 27 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio de la traducción.

III) La expresión de *bfpT* es autorregulada, y al igual que la de *bfpA*, es modulada por el medio de cultivo, la fase de crecimiento, la concentración de amonio y la temperatura.

IV) La expresión de *bfpT*, a diferencia de la de *bfpA*, ocurre durante toda la curva de crecimiento.

V) El efecto negativo del amonio sobre la expresión de *bfpT* y *bfpA* descrito en EPEC, no es observado en *E. coli* K12, por lo tanto otro u otros factores, propios de las cepas de EPEC, probablemente están involucrados en la regulación de *bfpA* y *bfpT* en respuesta a la concentración de amonio en el medio.

VI) La regulación de *bfpT* y *bfpA* por bajas temperaturas está mediada por un mecanismo común en las cepas de EPEC y no EPEC.

VII) El efecto que el pH, la concentración de hierro y la osmolaridad muestran sobre la secreción de las proteínas Esp de EPEC, no está relacionado a la influencia que estos mismos parámetros tienen sobre la expresión de *bfpA* o del locus regulador *bfpTVW*.

VIII) Las regiones reguladoras de *bfpA* y *bfpT* muestran una alta homología en un trecho rico en AT, indispensable para la activación dependiente de BfpT de dichos genes, por lo

De manera interesante, el extremo 3' de esta región en *bfpT*, localizada en la posición -26, sobrelapa la secuencia -35 del promotor; mientras que, en *bfpA* está localizada en la posición -45, corriente arriba del promotor.

IX) En resumen, nuestros resultados sugieren que la regulación de los genes *bfpA* y *bfpT* es un proceso multifactorial dependiente de BfpT. Por otra parte, no podemos descartar que la respuesta de *bfpA* a las señales ambientales sea mediada, por lo menos en parte, por los niveles de BfpT.

PERSPECTIVAS

El presente proyecto nos ha permitido plantear nuevas preguntas, encaminadas a entender mejor la regulación de estos genes por BfpT (PerA). Las perspectivas son:

I) Identificar las bases en la región corriente arriba del promotor de *bfpT* que son importantes para el reconocimiento por BfpT (PerA).

II) Analizar el papel que juegan los elementos invertidos repetidos y repetidos directos en la expresión y/o regulación de *bfpT* mediante mutagénesis sitio dirigida.

III) Analizar la aplicación de otras estrategias para la purificación de BfpT a fin de identificar el sitio de reconocimiento del regulador en el DNA.

IV) Analizar si la actividad residual detectada en las fusiones cortas, pUST54 y pUST66, son moduladas aun por la temperatura, la concentración de amonio y el crecimiento en LB.

V) Analizar la jerarquía de los efectos de las diferentes condiciones de cultivos sobre la expresión de los genes *bfpA* y *bfpT*, probando 2 o mas condiciones a la vez.

VI) Analizar el papel de los reguladores globales como H-NS, CRP, IHF, etc sobre la expresión de *bfpA* y *bfpT*.

VII) Analizar la expresión de *bfpA* y *bfpT* en un fondo genético mutante en *rpoS* y seguir la expresión durante la fase de crecimiento.

VIII) Estudiar los mecanismos de regulación negativa de los genes *bfp* en respuesta a la concentración de amonio, a la temperatura y al efecto del crecimiento en LB, mediante la obtención de mutantes que sobrepasen esta regulación.

IX) Realizar mutagénesis sitio dirigida en las regiones amino y carboxi terminal de BfpT, en aminoácidos conservados con otros reguladores de la familia AraC, a fin de analizar su papel en la regulación o unión al DNA.

La naturaleza es una esfera infinita de la cual el centro está en todas partes y la circunferencia en ningún lugar. (Blaise Pascal, 1670).

En el final, conservaremos solo aquello que amamos; amaremos solo aquello que entendamos; y entenderemos solo aquello en lo que hemos pensado. (Baba Dioum, 1968).

BIBLIOGRAFIA

- Atlung, T., and Ingmer, H.** 1997. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* **24**: 7-17.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E. Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K.** 1989. *Currents Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: Green Publishing Associates and John Wiley and Sons.
- Baldini, M. M., Nataro, J. P., and Kaper, J. B.** 1986. Localization of a determinant for Hep-2 by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **52**:334-336.
- Barrios, H., Fischer, H. M.; Hennecke, H., and Morett, E.** 1995. Overlapping promoters for two different RNA polymerase holoenzymes control *Bradyrhizobium japonicum nifA* expression. *J. Bacteriol.* **177**: 1760-1765.
- Bieber, D., Ramer, S. W., Wu, C. Y., Murray, W. J., Tobe, T., and Schoolnik, G.** 1998. Type IV pili transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **280**: 2114-2118.
- Brosius, J.** 1984. Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene* **27**:151-160.
- Brown, R.C., and Taylor, R. K.** 1995. Organization of *tcp*, *acf*, and *toxT* genes within a ToxT-dependent operon. *Mol. Microbiol.* **16**: 425-439.
- Bustamante, V. H., Calva, E., and Puente, J. L.** 1998. Analysis of the promoter and cis-acting elements involved in the BfpT-dependent expression of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 3013-3016.
- Caron, J., Coffield, L. M., and Scott, J. R.** 1989. A plasmid-encoded regulatory gene, *rns*, required for expression of the CS1 and CS2 adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:963-967.
- Casadaban, M.** 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**: 541-555.
- Champion, G. A., Neely, M. N., Brennan, M. A., and Dirita, V. J.** 1997. A branch in the ToxR regulatory cascade of *Vibrio cholerae* revealed by characterization of *toxT* mutant strains. *Mol Microbiol* **23**: 323-331.
- Cornelis, G., Sluiter, C., Lambert de Rouvroit, C., and Michiels, T.** 1989. Homology between VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon, and AraC, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator. *J. Bacteriol.* **171**:254-262.

- Cravioto, A., Gross, R., Scotland, S., and Rowe, B.** 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* **3**: 95-99.
- D'Orazio, S. E. F., and Collins, C. M.** 1995. UreR activates transcription at multiple promoters within the plasmid-encoded urease locus of the Enterobacteriaceae. *Mol. Microbiol.* **16**: 145-155.
- Donnenberg, M. S., Giron, J. A., Nataro, J. P., and Kaper, J. B.** 1992. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol. Microbiol.* **6**: 3427-3437.
- Donnenberg, M. S., and Kaper, J. B.** 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **60**: 3953-3961.
- Donnenberg, M. S., Yu, J., and Kaper, J. B.** 1993. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J. Bacteriol.* **175**: 4670-4680.
- Donnenberg, M. S., Kaper, J. B. and Finlay, B. B.** 1997. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol.* **5**: 109-114.
- Edwards, R. A., and Schifferli, D. M.** 1997. Differential regulation of *fasA* and *fasH* expression of *Escherichia coli* 987P fimbriae by environmental cues. *Mol. Microbiol.* **25**: 797-809.
- Edwards, R. A., and Puente, J. L.** 1998. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol.* **6**: 282-287.
- Elliott, S. J., Wainwright, L. A., McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Deng, Y., Lai, L. C., McNamara, B. P., Donnenberg, M. S., and Kaper, J. B.** 1998. The complete sequence of the locus enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **28**: 1-4.
- Forsman, K., Goransson, M., and Uhlin, B. E.** 1989. Autoregulation and multiple DNA interactions by a transcriptional regulatory protein in *E. coli* pili biogenesis. *EMBO J* **8**: 1271-1279.
- Foubister, V., Rosenshine, I., and Finlay, B. B.** 1994a. A diarrhoeal pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) triggers a flux of inositol phosphates in infected epithelial cells. *J. Exp. Med.* **179**: 993-998.

- Foubister, V., Rosenshine, I., Donnenberg, M. S., and Finlay, B.** 1994b. The *eaeB* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is necessary for signal transduction in epithelial cells. *Infect. Immun.* **62**: 3038-3040.
- Froehlich, B., Husmann, L., Caron, J., and Scott, J. R.** 1994. Regulation of *rns*, a positive regulatory factor for pili of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**: 5385-5392.
- Fyfe, J. A. M., and Davies, J. K.** 1998. An AT-rich tract containing an integration host factor-binding domain and two UP-like elements enhances transcription from the *pilEp1* promoter of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **180**: 2152-2159.
- Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., and Ramos, J. L.** 1997. AraC- XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* **61**: 393-410.
- Genin, S., Gough, C. L. Zischek, C., and Boucher, C. A.** 1992. Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Microbiol.* **16**: 3065-3076.
- Giron, J. A.; Ho, A. S. and Schoolnik, G. K.** 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**: 710-713.
- Giron, J. A., Levine, M. M., and Kaper, J. B.** 1994. Longus: a long pilus ultrastructure produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **12**: 71-82.
- Gomez-Duarte, O. G., and Kaper, J. B.** 1995. A plasmid encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**: 1767-1776.
- Goosney, D. L., de Grado, M., and Finlay, B. B.** 1999. Putting E. coli on a pedestal: a unique system to study signal transduction and the actin cytoskeleton. *Trends in Cell Biology* **9**: 11-14.
- de Haan, L. A. M., Willshaw, G. A., van der Zeijst, B. A. M., Gaastra, W.** 1991. The nucleotide sequence of a regulatory gene present on a plasmid in an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain of serotype O167:H5. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**: 341-346.
- Hanumura, A., and Aiba, H.** 1992. A new aspect of transcriptional control of the *Escherichia coli* *crp* gene: positive autoregulation. *Mol. Microbiol.* **6**: 2489-2497.
- Hawley, D. K., and McClure, W. R.** 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **11**: 2237-2255.

Hicks, S., Frankel, G., Kaper, J. B., Dougan, G., and Phillips, A. D. 1998. Role of intimin and bundle forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to paediatric intestine *in vitro*. *Infect. Immun.* **66**: 1570-1578.

Higgins, D. E. and DiRita, V. J. 1994. Transcriptional control of *toxT*, a regulatory gene in the ToxR regulon of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **14**: 17-29.

Hobbs, M., and Mattick, J. S. 1993. Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Mol. Microbiol.* **10**:233-243.

Ishimoto, K. S., and Lory, S. 1989. Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative sigma factor (RpoN) of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1954-1957.

Jarvis, K. G., Girón, J. A., Jerse, A. E., McDaniel, T. K., Donnenberg, M. S., and Kaper, J. B. 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a specialized secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7996-8000.

Jerse, A. E., Yu, J., Tall, B. D., and Kaper, J. B. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:7839-7843.

Jordi, B. J., Dagberg, B., de Haan, L., Hamers, A. M., van der Zeijst, B. A., Gaastra, W., and Uhlin, B. E. 1992. The positive regulator CfaD overcomes the repression mediated by the histone-like protein H-NS (H1) in the CFA/I fimbrial operon of *Escherichia coli*. *EMBO J* **11**: 2627-2632.

Jordi, B. J., van der Zeijst, B. A., and Gaastra, W. 1994. Regions of the CFA/I promoter involved in the activation by the transcriptional activator CfaD and repression by the histone-like protein H-NS. *Biochimie* **76**: 1052-1054.

Jost, B.H., and Adler, B. 1993. Site of transcriptional activation of *virB* on the large plasmid of *Shigella flexneri* 2a by VirF, a member of the AraC family of transcriptional activators. *Microbial Pathogenesis* **14**: 481-488.

Kaper, J. B. 1994. Molecular pathogenesis of enteropathogenic *Escherichia coli*. *in: Miller, V. L. ; Kaper, J. B ; Portnoy, D. A., and Isberg, R. R.* (Edits). *Molecular genetics of Bacterial pathogenesis.* cap 12, p 173 . ASM press

Kaper, J. B. 1998. EPEC delivers the goods. *Trends Microbiol.* **6**: 169-173.

Kato, J.I., Ito, K. I., Nakamura, A., and Waranabe, H. 1989. Cloning of regions required for contact hemolysis and entry into LL-MK2 cells from *Shigella sonnei* form I plasmid: *VirF* is a positive regulator gene for these phenotypes. *Infect. Immun.* **57**: 1391-1398.

Kenny, B., and Finlay, B. 1995. Secretion of proteins by enteropathogenic *Escherichia coli* which mediate signaling in host epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7991-7995.

Kenny, B., Lai, L. C., Finlay, B., and Sonnenberg, M. S. 1996. *EspA*, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **20**: 313-323.

Kenny, B., Abe, A., Stein, M., and Finlay, B. 1997a. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* **65**: 2606-2612.

Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D. J., Frey, E. A., and Finlay, B. B. 1997b. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**: 511-520.

Klaasen, P., and de Graaf, F.K. 1990. Characterization of *FapR*, a positive regulator of expression of the 987P operon in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **4**: 1779-1783.

Knutton, S., Baldini, M. M., Kaper, J. B., and McNeish, A. S. 1987. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Infect. Immun.* **55**: 78-85.

Knutton, S., Adu-Bobie, J., Bain, C., Phillips, A.D., Dougan, G., and Frankel, G. 1997. Down-regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion. *Infect. Immun.* **65**: 1644-1652.

Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M. J., Nisan, I., Neves, B. C., Bain, C., Wolff, C., Dougan, G., and Frankel, G. 1998. A novel *EspA*-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* **17**: 2166-2176.

Law, D. 1994. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**:152-173.

Lai, L. C., Wainwright, L. A., Stone, K. D., and Sonnenberg, M. S. 1997. A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. *Infect. Immun.* **65**: 2211-2217.

Lebeau C., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R. P., and Etienne, J. 1994. Coagulase expression in *Staphylococcus aureus* is positively and negatively modulated by an *agr*-dependent mechanism. *J. Bacteriol.* **176**: 5534-5536.

Levine, M. M., and Edelman, R. 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol. Rev.* **6**:31-51.

Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**: 377-385.

Loewen, P. C., and Hengge-Aronis, R. 1994. The role of the sigma factor (KatF) in bacterial regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 53-80.

Low, R., Braaten, B., and van der Woude, M. 1996. Fimbriae. In **Neidhart, F. C.,** (eds). *Escherichia coli* and *Salmonella* cellular and molecular biology. Second edition pp. 146-157. ASM Press, Washington, D.C.

Manjarrez-Hernandez, H. A., Baldwin, T. J., Aitken, A., Knutton, S., and Williams, P. H. 1992. Intestinal epithelial cell protein phosphorylation in enteropathogenic *Escherichia coli* diarrhoea. *Lancet* **339**: 521-523.

Martin, R. G., Jair, K. W., Wolf Jr., R. E., and Rosner, J. L. 1996. Autoactivation of the *marRAB* multiple antibiotic resistance operon by MarA transcriptional activator in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 2216-2223.

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

Maurelli, A. T. 1989. Temperature regulation of virulence genes in pathogenic bacteria: a general strategy for human pathogens?. *Microbial Pathogenesis* **7**: 1-10

Mayer, M. P. 1995 A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**: 41-46.

McConnell, M. M., Chart, H., Scotland, S. M., Smith, H. R., Willshaw, G. A, and Rowe, B. 1989. Properties of adherence factor plasmids of enteropathogenic *Escherichia coli* and the effect of host strain on expression of adherence to HEp-2 cells. *J. Gen. Microbiol.* **135**:1123-1134.

McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S, and Kaper, J. B. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:1664-1668.

- McDaniel, T. K., and Kaper, J. B.** 1997. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K12. *Mol. Microbiol.* **23**:399-407.
- McIver, K. S., and Scott, J. R.** 1997. Role of *mga* in growth phase regulation of virulence genes of the group A Streptococcus. *J Bacteriol* **179**: 5178-5187.
- Mekalanos, J. J.** 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* **174**: 1-7.
- Mellies, J. L., Elliott, S. J., Sperandio, V., Sonnenberg, M. S., and Kaper, J. B.** 1999. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). **33**: 296-306
- Murphree, D., Froehlich, B., and Scott, J. R.** 1997. Transcriptional control of genes encoding CS1 pili: negative regulation by a silencer and positive regulation by Rns. *J Bacteriol* **179**: 5736-5743.
- Nataro, J. P., Baldini, M., Kaper, J. B., Black, R., Bravo, N., and Levine, M.** 1985. Detection of adherent factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. *J Infect Dis* **152**: 560-565.
- Nataro, J. P., Maher, K. O., Mackie, P., and Kaper, J. B.** 1987. Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **55**: 2370-2377.
- Nataro, J. P. and Kaper, J. B.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.
- Nataro, J. P., Yikang, D., Yingkang, D., and Walker, K.** 1994. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **176**: 4691-4699
- Ogierman, M. A., and Manning, P. A.** 1992. Homology of TcpN, a putative regulatory protein of *Vibrio cholerae*, to the AraC family of transcriptional activators. *Gene* **116**:93-97.
- Polotsky, Y., Dragunsky, E., and Khavkin, T.** 1994. Morphologic evaluation of the pathogenesis of bacterial enteric infections. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**: 161-208.
- Puente, J. L., Bieber, D., Ramer, S. W., Murray, W., and Schoolnik G. K.** 1996. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* **20**: 87-100.

Ramer, S. W., Bieber, D., and Schoolnik G. K. 1996. BfpB, an outer membrane lipoprotein required for the biogenesis of bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 6555-6563

Rosenshine, I., Donnenberg, M. S., Kaper, J. B., and Finlay, B. B. 1992. Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *EMBO J* **11**: 3551-3560.

Rosenshine, I., Ruschkowsky, S., Stein, M., Reinscheid, D., and Finlay, B. B. 1996. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates pseudopod formation. *EMBO J* **15**: 2613-2624.

Ross, W., Gosink, K., Solomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K., and Gourse, R. L. 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the α subunit of the RNA polymerase. *Science* **262**: 1407-1413.

Roy, C., Miller, J. F. and Falkow, S. 1990. Autogenous regulation of the *Bordetella pertussis* *bvgABC* operon. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3763-3767.

Sakai, T., Sasakawa, C., Makino, S., and Yoshikawa, M. 1986. DNA sequence and product analysis of the *virF* locus responsible for Congo red binding and cell invasion in *Shigella flexneri* 2a. *Infect. Immun.* **54**:395-402.

Salyers, A. A., and Whitt, D. D. 1994. *Escherichia coli* gastrointestinal infections. *In* Bacterial pathogenesis. cap 16, p 190 . ASM press

Sambrook, J., Nivklen, S., and Coulson, A. R. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanchez-SanMartin, C., Sosa, M. G., Bustamante, V. H., Calva, E. and Puente, J. L. 1999. Transcriptional organization and regulation of *orf19*, *tir*, *orfU* and *eae* genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. Abstr. BD-227. In Abstracts of the ASM 99TH General Meeting. American Society for Microbiology, Chicago, Ill. USA

Savelkoul, P. H., Willshow, G. A., McConnell, M. M., Smith, H. R., Hamers, A. M., van der Zeijst, B. A., and Gastra, W. 1990. Expression of CFA-I fimbriae is positively regulated. *Microb Pathog* **8**: 91-99.

Scaletsky, I. C. A., Silva, M. L. M., and Trabulsi, L. R. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* **45**:534-536.

Shadel, G. S., and Baldwin, T. O. 1992. Positive autoregulation of the *Vibrio fischeri luxR* gene. *J Biol Chem* **267**: 7696-7702.

Skorupski, K and Taylor, R. K. 1997. Control of the ToxR virulence regulon in *Vibrio cholerae* by environmental stimuli. *Mol Microbiol* **25**: 1003-1009.

Sohel, I., Puente, J. L., Murray, W. J., Vuopio-Varkila, J., and Schoolnik, G. K. 1993. Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes. *Mol Microbiol* **7**: 563-575.

Sohel, I., Puente, J. L., Ramer, S. W., Bieber, D., Wu, C. H., and Schoolnik, G. K. 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J Bacteriol* **178**: 2613 - 2628.

Stone, K.D., Zhang, H-Z., Carlson, L.K., and Donnenberg, M. S. 1996. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol Microbiol* **20**: 325-337.

Strom, M. S., and Lory, S. 1993. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**:565-596.

Taniguchi, T., Fujino, Y., Yamamoto, K., Miwatani, T., and Honda, I.1995. Sequencing of the gene encoding major pilin of pilus colonization factor antigen III (CFA/III) of human enterotoxigenic *E. coli* and evidence that CFA/III is related to type IV pili. *Infect. Immun* **63** (2): 724 - 728.

Tobe, T., Yoshikawa, M., Mizuno, T., and Sasakawa, C. 1993 Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* of *Shigella flexneri*: activation by VirF and repression by H-NS. *J Bacteriol* **175**: 6142-6149.

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

Vicente, M., Kushner, S. R., Garrido, T., and Aldea, M. 1991. The role of the gearbox in the transcription of essential genes. *Mol Microbiol* **5**: 2085-2091.

Vuopio-Varkila, J., and Schoolnik, G. K. 1991. Localized adherence by enteropathogenic *Escherichia coli* is an inducible phenotype associated with the expression of new outer membrane proteins. *J Exp Med* **174**: 1167-1177.

Wang, R. F., and Kushner, S. R. 1991. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**: 195-199.

Wolff, C., Nisan, I., Hanski, E., Frankel, G., and Rosenshine, I. 1998. Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**: 143-155.

ANEXO

Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*

Ygnacio Martínez-Laguna,[†] Edmundo Calva and José Luis Puente*

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico.

Summary

Expression of *bfpA*, the gene coding for the structural subunit of the bundle-forming pili (BFP) in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), requires the product of *bfpT* (also called *perA*), a member of the AraC family of transcriptional regulators. Here, we show that *bfpT*–*cat* fusions were not expressed in a *bfpT*[–] or in a non-EPEC strain, unless a functional *bfpT* was present, indicating that an autoregulatory mechanism is involved in expression. Further experiments with *bfpT*–*cat* fusions and primer extension analysis showed that *bfpT* is transcribed from a conventional sigma-70 promoter and that it is expressed throughout the growth curve. It is regulated in response to the ammonium concentration, temperature and growth media, in the same proportions as those described previously for *bfpA*. In addition, *bfpT* and *bfpA* expression was also modulated by osmolarity, but was not affected by pH, iron excess or limitation. Deletion analysis of the *bfpT* upstream region revealed that a DNA segment of 81 bp, extending upstream from the transcriptional start site, contained all the sequence elements required for maximal expression of *bfpT*. Furthermore, it shares significant homology with a *bfpA* upstream AT-rich region, which has been shown to be involved in the BfpT-dependent regulation of *bfpA*. Interestingly, ammonium repression was observed only when *bfpT*–*cat* or *bfpA*–*cat* expression was complemented in an EPEC background, whereas low-temperature regulation was observed in both EPEC and non-EPEC strains. This suggests that specific

regulatory elements are present in EPEC, while others are shared with non-pathogenic *E. coli*.

Introduction

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), one of several categories of diarrhoeagenic *E. coli*, is a common cause of diarrhoea in very young infants living in developing countries (Nataro and Kaper, 1998). Active research on EPEC pathogenesis has rapidly given insights into the mechanisms that allow an infection to proceed, although many aspects remain unclear. EPEC interactions with the host cells result in the formation of attaching and effacing (A/E) lesions, which involve a complex series of events that has been divided into three stages (Donnenberg *et al.*, 1997; Kaper, 1998).

The first stage involves the initial non-intimate attachment of EPEC to the epithelial cell surface as discrete circumscribed microcolonies. This pattern of attachment, termed localized adherence (LA) (Cravioto *et al.*, 1979; Scaletsky *et al.*, 1984; Knutton *et al.*, 1987; Vuopio-Varkila and Schoolnik, 1991), is considered to be a common property of the classic EPEC serotypes (Nataro *et al.*, 1987) and is associated with the production of a type IV fimbriae known as bundle-forming pili (BFP) (Girón *et al.*, 1991). Production of the BFP filament is directed by the *bfp* operon, which is located in the 80 kb EPEC adherence factor (EAF) plasmid (Sohel *et al.*, 1993; 1996; Stone *et al.*, 1996).

During the second stage, a set of EPEC-secreted proteins, such as the products of the chromosomal *espA*, *espB* and *espD* genes, triggers the activation of signal transduction pathways leading to a complex response by the epithelial cell (Foubister *et al.*, 1994a; Kenny and Finlay, 1995; Kenny *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 1997). This response is characterized by the phosphorylation of host proteins such as phospholipase C, the induction of inositol phosphate flux and of important rearrangements of the host cytoskeleton, and the effacement of the microvilli (Manjarrez *et al.*, 1992; Rosenshine *et al.*, 1992; Foubister *et al.*, 1994b). Recently, it has been shown that EspA is a major component of a bacterial surface filamentous appendage that favours the initial binding of EPEC to the host cell, which is required for the translocation of secreted proteins such as EspB (Knutton *et al.*, 1998; Wolff *et al.*,

Received 4 February, 1999; revised 30 March, 1999; accepted 8 April, 1999. †Present address: Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, Mexico. *For correspondence. E-mail puente@ibt.unam.mx; Tel. (+52) 73 29 1621; Fax (+52) 73 17 2388.

1998). The secretion of these proteins depends on a specialized type III secretion system encoded by the *esc* and *sep* genes (Jarvis *et al.*, 1995).

Finally, the product of the *eae* gene, an outer membrane protein called intimin, allows EPEC to reorganize the polymerized actin and other host cytoskeletal proteins, leading to the formation of cup-like pedestal structures to which EPEC attach intimately upon interaction with the tyrosine-phosphorylated form of Tir (a translocated protein of bacterial origin previously called Hp90), which constitutes the intimin receptor (Rosenshine *et al.*, 1996; Kenny *et al.*, 1997a). The genes responsible for the production of the A/E lesion (e.g. the *esc/sep* cluster and the *esp*, *tir* and *eae* genes) are encoded by a chromosomal region called LEE (locus for *enterocyte effacement*) (Elliot *et al.*, 1998).

Regulation of virulence gene expression in EPEC is less well documented. The expression of BFP is regulated at the transcriptional level by a promoter upstream of *bfpA*, the first gene of the *bfp* operon, which seems to determine the co-ordinate regulation of downstream genes (Puente *et al.*, 1996; Ramer *et al.*, 1996; Bustamante *et al.*, 1998). This expression occurs selectively during the exponential phase of growth in tissue culture media, where it is modulated by the ammonium concentration and by temperature (Puente *et al.*, 1996), and requires the product of the *bfpT* gene, which is the first gene of the *bfpTVW* operon, located 18 kb downstream of *bfpA* on the EAF plasmid (Tobe *et al.*, 1996; C. Sánchez-SanMartín and J. L. Puente, unpublished observations).

The *bfpTVW* operon, previously identified as the *per* locus, has also been involved in the regulation of the chromosomally located *eae* gene and in the production and/

or secretion of EspB and other secreted proteins that also respond to conditions that regulate *bfpA* expression (Gómez-Duarte and Kaper, 1995; Kenny and Finlay, 1995; Kenny *et al.*, 1997a,b; Knutton *et al.*, 1997). Furthermore, it has also been suggested that the initial contact with HeLa cells induces *de novo* protein synthesis by EPEC and activation of its type III secretion system (Rosenshine *et al.*, 1996; Wolff *et al.*, 1998). However, the molecular basis of these phenomena remains to be elucidated.

bfpT (also called *perA*) encodes a 31 783 Da protein (274 amino acids), which belongs to the AraC/XylS family of transcriptional factors (Tobe *et al.*, 1996). The proteins belonging to this family are involved in the regulation of three main functions: carbon metabolism, stress response and pathogenesis (Gallegos *et al.*, 1997). The closest homologues of BfpT (PerA), such as Rns, CfaR, CsvR, FasH and AggR, are all positive regulators of fimbrial expression in *E. coli* (Caron *et al.*, 1989; Klaasen and de Graaf, 1990; de Haan *et al.*, 1991; Jordi *et al.*, 1992; Nataro *et al.*, 1994; Edwards and Schifferli, 1997).

The potential role of BfpT in the co-ordinate regulation of virulence gene expression in EPEC prompted us to analyse some of its regulatory features, which are presented herein.

Results

Deletion analysis of the upstream sequence required for *bfpT* expression

We have shown previously that *bfpA*–*cat* fusions can be used to monitor *bfpA* expression under different growth conditions (Puente *et al.*, 1996). Thus, in order to

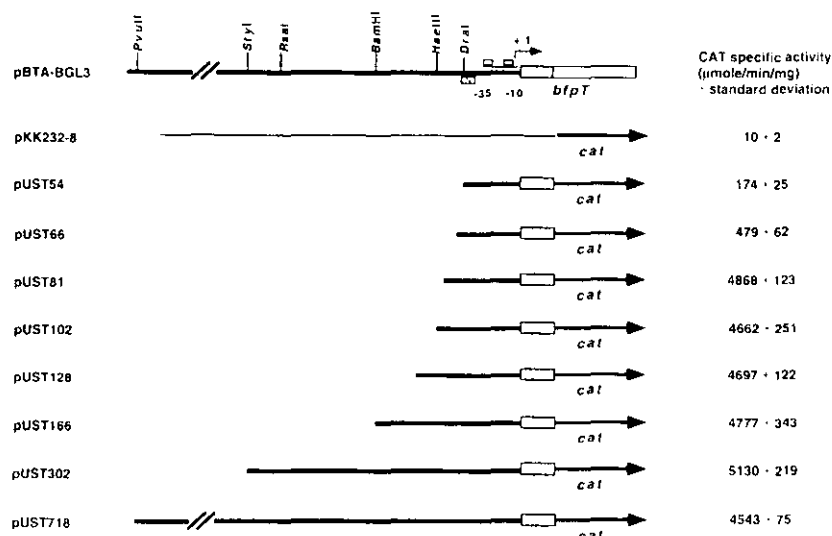


Fig. 1. *bfpT*–*cat* transcriptional fusion activity. Expression directed by various lengths of the 5' regulatory region of *bfpT*, fused to the *cat* reporter gene, harboured in EPEC B171-8. Samples were collected hourly (time points 6–11) from DMEM cultures at 37°C. The CAT specific activities shown in the right column correspond to 8 h of growth ($OD_{600} = 1.2$) and are the average of at least four different experiments. pKK232-8 activity corresponds to background levels. Differing lengths of the *bfpT* 5' upstream region were generated by cloning restriction- or PCR-generated fragments into vector pKK232-8, which contains a promoterless chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) gene. Plasmid denominations denote the size of the *bfpT* 5' upstream fragment from the transcriptional start. The location of the putative –10 and –35 promoter elements is indicated. The box below the line represents the homologous region identified by Bustamante *et al.*, 1998. Restriction sites used for the construction of plasmids (pUST54, 102, 166, 302 and 718) are indicated.

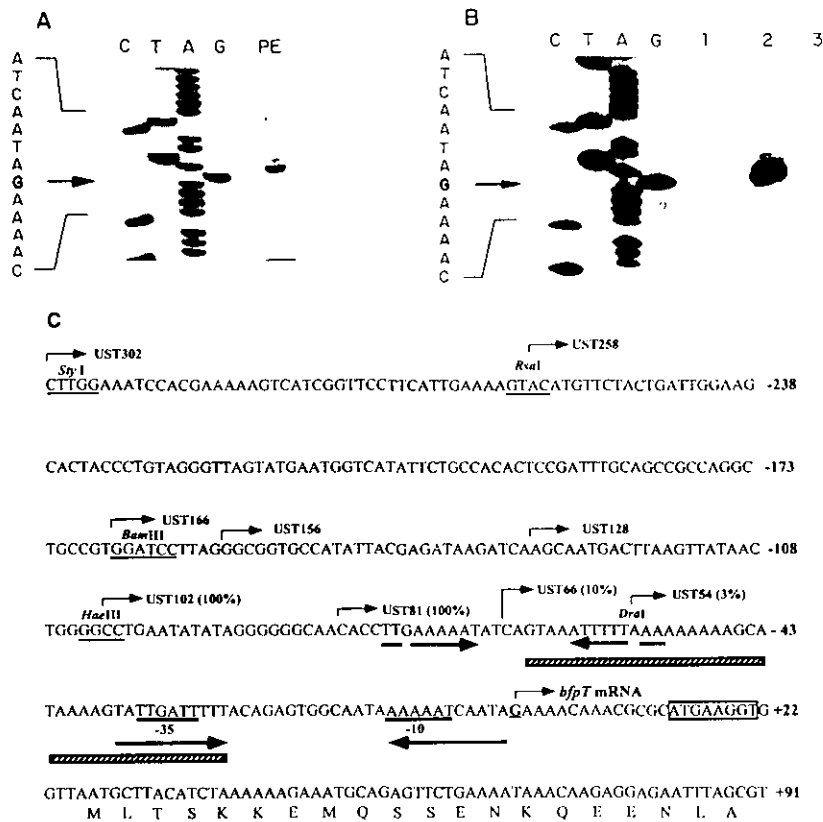


Fig. 2. Promoter analysis in *bfpT*.

A. Mapping of the *bfpT* transcriptional start site by primer extension analysis. Total RNA was extracted from culture samples of strain B171-8 collected after 4 h of exponential growth in DMEM at 37°C (OD₆₀₀ = 0.6). A primer specific for the *bfpT* structural gene (*Experimental procedures*) and *bfpT* mRNA as template (15 µg of total RNA) were used. The arrow indicates the transcriptional start site, 27 bp upstream from the *bfpT* translational start codon (lane marked as PE).

B. Analysis of *bfpT*-*cat* transcription by primer extension. Total RNA was extracted from culture samples of strains B171-8/pUST54 (lane 1), B171-8/pUST166 (lane 2) and T::Gm^r (*bfpT* mutant)/pUST166 (lane 3), collected after 4 h of exponential growth in DMEM at 37°C. A primer specific for the *cat* structural gene (*Experimental procedures*) and *bfpT*-*cat* mRNA as template (5 µg of total RNA) were used. The arrow indicates the same transcriptional start site (lanes 1 and 2) as that shown in (A). The primer extension product was not observed with mRNA from the *bfpT*⁻ strain (lane 3), which had shown background levels of CAT activity (see Fig. 3). The weaker signal in lane 1 correlates with the lower expression of CAT activity shown by the strain carrying pUST54 (see Fig. 1B).

C. Nucleotide sequence of the upstream regulatory region of *bfpT*. The underlined and bold G, with a broken horizontal arrow, indicates the transcriptional start site (*bfpT* mRNA). The -35 and -10 promoter consensus sequences (underlined) were located according to the primer extension results (see A, B and Fig. 6A). The putative Shine-Dalgarno sequence (RBS) is boxed. Arrows show inverted repeat symmetry elements. The regions used for the construction of the *bfpT*-*cat* fusions are indicated (broken arrows): the number indicates the distance in bp from the transcriptional start site, and the percentage in parenthesis indicates the relative activity with respect to the UST166 fusion. The hatched box shows a 40 bp AT-rich homologous motif with the 5' *bfpA* upstream regulatory region.

define the upstream sequence that is required for *bfpT* expression, a series of transcriptional fusions was constructed. Polymerase chain reaction (PCR) or restriction fragments, containing the initial 14 codons of the *bfpT* structural gene and progressively longer sequences upstream of the *bfpT* transcriptional start site (see below), were cloned into vector pKK232-8 upstream of a promoterless *cat* gene, as described in *Experimental procedures*. The resulting plasmids (Fig. 1) were transformed into EPEC strain B171-8 (see Table 1).

The expression of CAT activity by B171-8, carrying the different *bfpT*-*cat* fusions grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) at 37°C, is shown in Fig. 1. These

were conditions shown previously to induce *bfpA* expression (Puente *et al.*, 1996). The relative expression of these fusions was determined at different OD₆₀₀ values, i.e. at 1.0, 1.2 and 1.4, where maximal expression was observed. Fusions containing fragments up to position -81 (pUST81) or longer were found to express approximately equal amounts of CAT under these growth conditions (Fig. 1). However, fusions up to position -66 (pUST66) and -54 (pUST54) produced only about 10% and 4% of the CAT activity obtained with pUST81, respectively, indicating that the *cis*-acting DNA elements required for *bfpT* maximal expression were located up to position -81 (Fig. 2C).

Identification of the *bfpT* transcriptional start site

Primer extension analysis was used to identify the position of the 5' end of the *bfpT* transcript. Total cellular RNA prepared from strain B171-8, grown for 4 h ($OD_{600} = 0.6$) in DMEM at 37°C was hybridized to an internal primer to the 5' *bfpT* coding region. This primer was also used in a DNA sequencing reaction to determine the start site of the primer extension product: it corresponded to a G-residue located 27 bp upstream of the *bfpT* translational start codon (Fig. 2A and C).

In order to evaluate whether the activity of the *bfpT*-*cat* fusions was directed by the same promoter predicted for the wild-type gene (Fig. 2B), primer extension analysis was also performed to determine the position of the 5' end of the *bfpT*-*cat* message. Total cellular RNA prepared from strains B171-8/pUST166 and B171-8/pUST54, grown under the same conditions as those described above, was hybridized to an internal primer to the *cat* gene coding region. Comparison of the reverse transcription product obtained from B171-8/pUST166 RNA with the sequence ladder obtained with the same primer and pUST166 DNA as template identified the same G-residue, 27 bp upstream from the translational start codon (Fig. 2B, lane 2). The weaker signal obtained for RNA from the strain carrying pUST54 (Fig. 2B, lane 1) correlates with the lower expression of CAT activity shown by this fusion (Fig. 1), confirming that the wild-type promoter is still active, although some elements were removed that allow its full activation.

Examination of the *bfpT* 5' upstream sequence revealed the presence of putative -35 (TTGATT) and -10 (AAAAAT) promoter sequences (underlined in Fig. 2C)

correctly spaced by 17 bp. In both regions, four out of six positions match the *E. coli* consensus, allowing the prediction of a conventional (sigma-70-dependent) promoter (Fig. 2C). A putative ribosomal binding site was located 7 nucleotides upstream of the translational initiation codon (Fig. 2C). Furthermore, an AT-rich sequence, containing direct and inverted repeats, was found downstream of position -81 and upstream of the predicted -35 promoter region (Fig. 2C; see below).

Positive autoregulation of *bfpT*

CAT activity of *bfpT*-*cat* fusions was near background levels, when determined in *E. coli* MC4100 (a non-EPEC laboratory strain; data not shown), suggesting that the transcriptional activation of *bfpT* required a regulatory factor only present in EPEC, or that it was subject to an autoregulatory mechanism. In order to assess this last possibility, plasmids pUST166 (*bfpT*-*cat* fusion) and pCAT232 (*bfpA*-*cat* fusion) were introduced into EPEC wild-type strain B171-8 and into its *bfpT* mutant derivative (strain B171-T::Gm^r) (Table 1). Determination of the CAT specific activity in each of these strains revealed that the elimination of *bfpT* abolished the expression of *bfpT*-*cat*, indicating that BfpT activates its own expression (Fig. 3). As shown originally (Tobe *et al.*, 1996; Bustamante *et al.*, 1998), the expression of *bfpA*-*cat* was also negative in the *bfpT* mutant strain (Fig. 3). Furthermore, primer extension experiments also showed that synthesis of *bfpT* and *bfpT*-*cat* mRNA was not detected in the *bfpT*⁻ strain (B171-T::Gm^r) carrying pUST166 (Fig. 2B, lane 3; and data not shown).

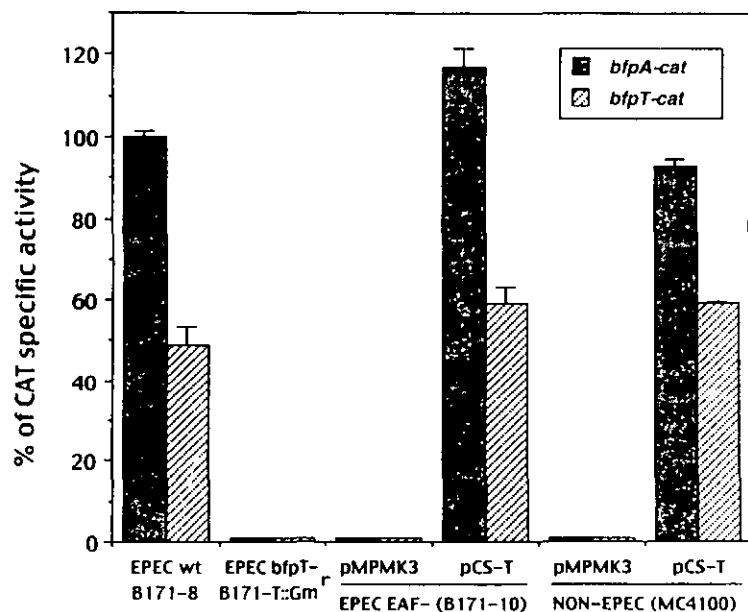


Fig. 3. Expression of *bfpT* requires the presence of a functional BfpT protein. EPEC strains B171-8 (wild type), B171-T::Gm^r (a *bfpT* mutant strain derived from B171-8) and B171-10 (a B171-8 derivative cured of the EAF plasmid) carrying either pMPMK-K3 (the cloning vector) or pCS-T (a pMPMK-K3 derivative carrying the *bfpT* gene) and *E. coli* K-12 strains MC4100/pMPMK-K3 and MC4100/pCS-T were transformed with either pCAT232 (carrying the *bfpA*-*cat* fusion) or pUST166 (carrying the *bfpT*-*cat* fusion) and grown in DMEM at 37°C. CAT specific activity was determined after 9 h ($OD_{600} = 1.4$) of growth and plotted as the percentage relative to the *bfpA*-*cat* fusion in the wild type.

To determine whether BfpT also promotes its own transcription and to test whether the effect seen in B171-T::Gm^r was caused only by the absence of a functional *bfpT* gene, plasmids pUST166 or pCAT232 were introduced into strains EPEC B171-10 (a pEAF⁻ EPEC strain) and *E. coli* MC4100 (a non-EPEC strain), both complemented with either plasmid pMPM-K3 (the cloning vector) or plasmid pCS-T (a pMPM-K3 derivative carrying a functional *bfpT* gene) (Fig. 3). The CAT specific activity in these strains showed that, when *bfpT* was placed *in trans*, it allowed the transcriptional activation of either *bfpT* or *bfpA*, whereas the vector was unable to activate either fusion (Fig. 3).

Expression of *bfpT* occurs throughout the growth curve

To test whether *bfpT* expression was also regulated by the growth phase, as previously shown for *bfpA* (Puente *et al.*, 1996), its transcription in the wild-type strain (B171-8) was examined along the growth curve in DMEM at 37°C. CAT activity determined from culture samples of B171-8/pUST166 (*bfpT*-*cat* fusion), taken every hour, showed that *bfpT* transcription was activated early during growth and was constant throughout the growth curve, resulting in maximal accumulation of CAT during the early stationary

phase (Fig. 4A) and in constant mRNA levels (Fig. 4C). In contrast, *bfpA* was only expressed during the exponential phase (Puente *et al.*, 1996; Fig. 4B and C). This observation was confirmed further by primer extension analysis of total RNA isolated from hourly culture samples of EPEC B171-8 (data not shown).

Expression of *bfpT* and *bfpA* follows the same pattern of regulation in response to the growth media, the ammonium concentration and temperature

The results described above prompted us to examine whether *bfpT* transcription was also modulated by the same environmental cues that were shown previously to regulate *bfpA* expression, such as the growth media, the ammonium concentration and temperature (Puente *et al.*, 1996). The effect of growth media on the expression of *bfpA*-*cat* and *bfpT*-*cat* was analysed by growing strains B171-8/pUST166 (*bfpT*-*cat* fusion) and B171-8/pCAT232 (*bfpA*-*cat* fusion) in LB and DMEM at 37°C. CAT activity was determined every hour; activities at OD₆₀₀ of 1.4 are shown in Fig. 5A for comparison. The relative expression was maintained throughout the growth curve. Expression of *bfpT*-*cat* in LB showed 87% less activity than in DMEM (Fig. 5A), which was similar to the reduction seen

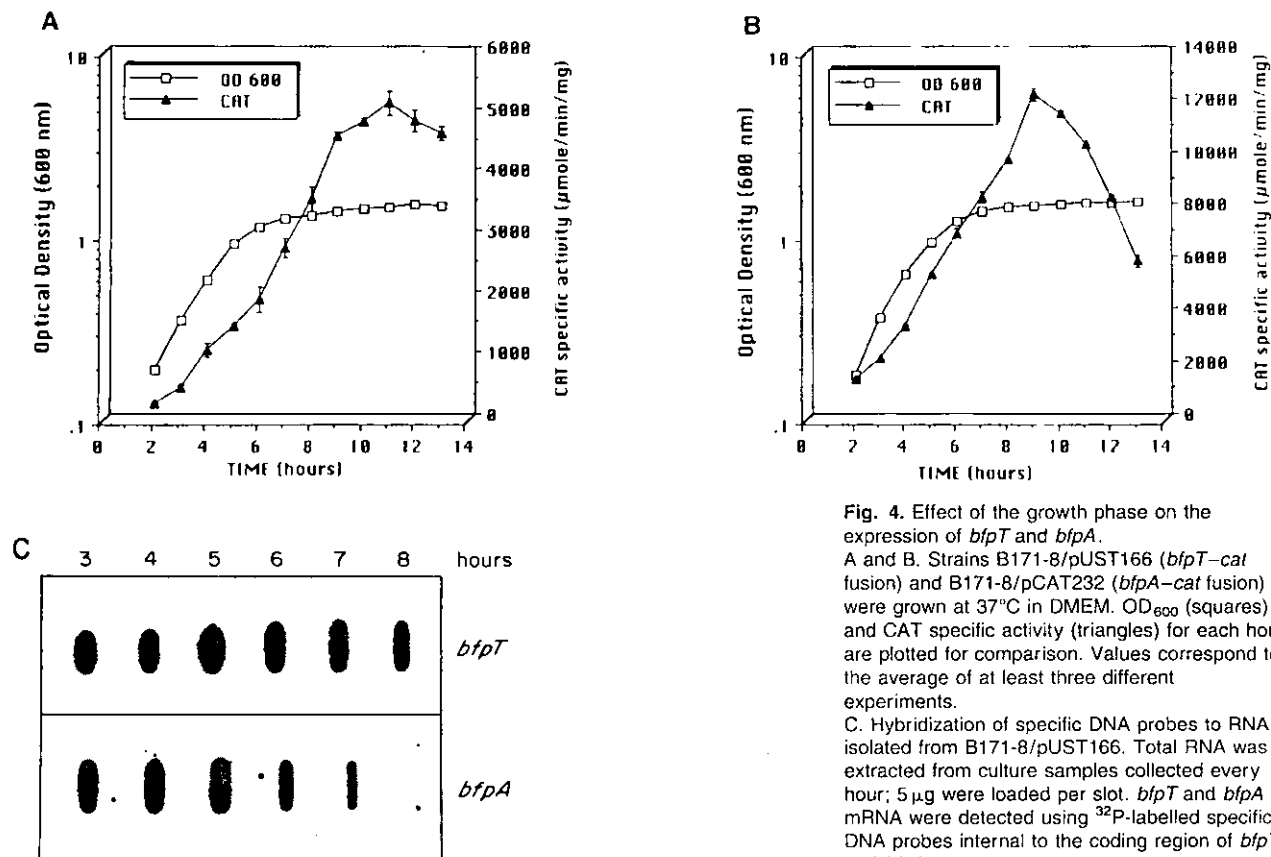


Fig. 4. Effect of the growth phase on the expression of *bfpT* and *bfpA*.

A and B. Strains B171-8/pUST166 (*bfpT*-*cat* fusion) and B171-8/pCAT232 (*bfpA*-*cat* fusion) were grown at 37°C in DMEM. OD₆₀₀ (squares) and CAT specific activity (triangles) for each hour are plotted for comparison. Values correspond to the average of at least three different experiments.

C. Hybridization of specific DNA probes to RNA isolated from B171-8/pUST166. Total RNA was extracted from culture samples collected every hour; 5 μg were loaded per slot. *bfpT* and *bfpA* mRNA were detected using ³²P-labelled specific DNA probes internal to the coding region of *bfpT* and *bfpA*.

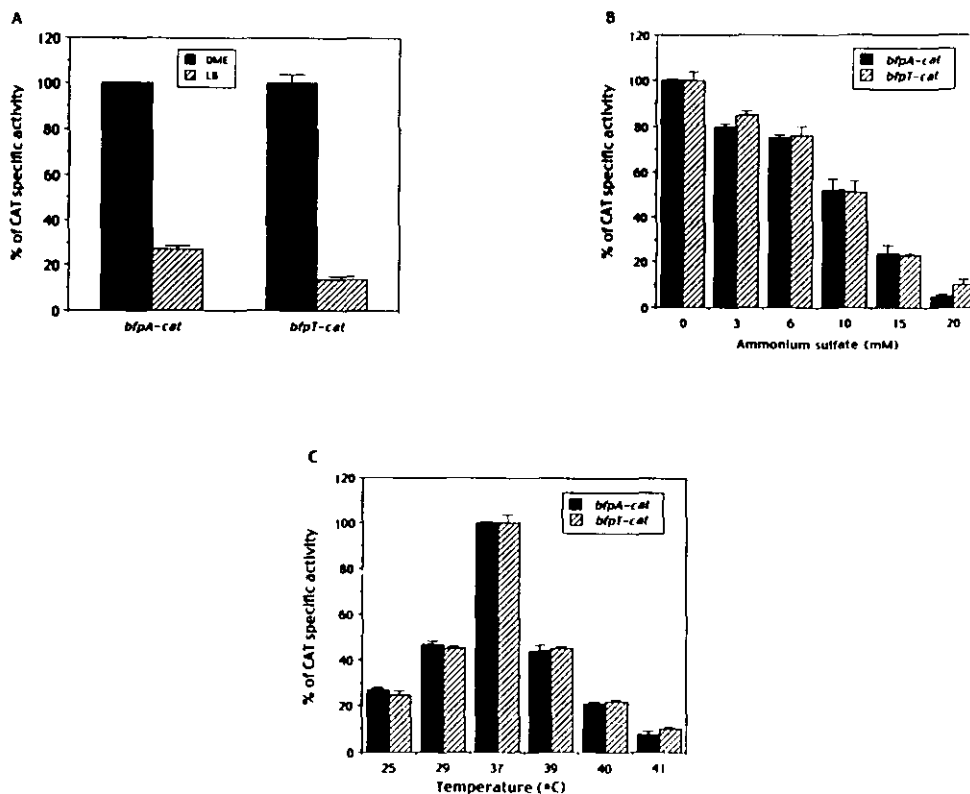


Fig. 5. Effect of growth media, ammonium and temperature on *bfpT* and *bfpA* expression.

A. Strains B171-8/pCAT232 (*bfpA-cat* fusion) and B171-8/pUST166 (*bfpT-cat* fusion) were grown at 37°C in either DMEM or LB. The CAT specific activity was determined at 9–10 h of growth at $OD_{600} = 1.4$.

B. Strains B171-8/pCAT232 and B171-8/pUST166 were grown in DMEM at 37°C together with the indicated concentrations of ammonium sulphate, originally shown to repress the expression of *bfpA* (Puente *et al.*, 1996). CAT specific activities are plotted as the percentage of the maximum CAT activity observed for each fusion in the absence of ammonium. The presence of ammonium did not significantly alter the growth kinetics (data not shown). Values correspond to the average of at least three different experiments.

C. Strains B171-8/pCAT232 and B171-8/pUST166, were grown in DMEM at the indicated temperature. CAT specific activity was determined from samples taken hourly (time points 6–11). The maximum CAT specific activity obtained at each temperature is represented as a percentage of the maximum CAT specific activity observed at 37°C for each fusion. The results are the average of at least three different experiments.

for *bfpA-cat* under the same conditions. Nevertheless, although *bfpT* expression follows the same pattern as *bfpA* expression, *bfpT* transcription showed a twofold lower level as assessed by *cat* fusion activity (see maximum activity in Fig. 4A and B).

Furthermore, as shown in Fig. 5B, when the same strains were grown in DMEM or DMEM plus 3, 6, 10, 15 or 20 mM ammonium sulphate at concentrations that did not significantly alter the growth kinetics (data not shown), *bfpT-cat* and *bfpA-cat* expression was gradually reduced. For example, the addition of 15 and 20 mM ammonium sulphate reduced *bfpT-cat* activity to 23% and 10%, respectively, with respect to the activity reached in the absence of ammonium; this was proportionally similar to the reduction seen for *bfpA-cat* under the same conditions.

The expression of *bfpT* in DMEM, under temperatures ranging from 25°C to 41°C, was also examined. As temperatures between 25°C and 29°C significantly reduced

the growth rate (data not shown), CAT activity was thus compared from culture samples collected at the same OD_{600} of 1.4. A significant reduction in *bfpT-cat* expression was observed at 25°C, 29°C, 39°C and 41°C, with respect to its maximal activity reached at 37°C (Fig. 5C). Again, this reduction was similar to that observed for *bfpA-cat*.

The observations described above were confirmed further by primer extension analysis (Fig. 6). Strain B171-8/pUST166 was grown in LB or DMEM at 29°C, 37°C and 39°C, and in DMEM plus 15 mM ammonium sulphate at 37°C, and samples were collected at an OD_{600} of 0.6. Total RNA was extracted from these samples, and primer extension reactions were performed using a ^{32}P -labelled oligonucleotide, specific for the wild-type *bfpT* transcript (Fig. 6A). Under all conditions tested, the transcription start site corresponded to the same G-residue previously located 27 bp upstream from the *bfpT* translation start codon (see Fig. 2). However, the weaker signals

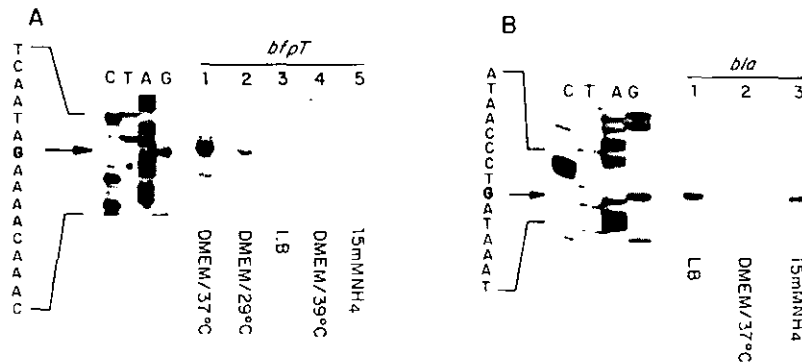


Fig. 6. Effect of growth media, temperature and ammonium on *bfpT* transcription. Primer extension analysis was performed on total RNA extracted from strain B171-8/pUST166, collected at an OD₆₀₀ of 0.6, grown in DMEM medium at 37°C (A, lane 1; and B, lane 2), DMEM medium at 29°C (A, lane 2), LB at 37°C (A, lane 3; and B, lane 1), DMEM medium at 39°C (A, lane 4) and DMEM plus 15 mM ammonium sulphate (A, lane 5; and B, lane 3) at 37°C.

A. A primer specific for the *bfpT* structural gene and *bfpT* mRNA as template (15 µg of total mRNA) were used. The arrow indicates the transcriptional start site identified 27 bp upstream from the *bfpT* translational codon (lanes 1–3).

B. A primer specific for the β-lactamase (*bla*) structural gene (carried by pKK232-8, the cloning vector used for the construction of *bfpT-cat* fusions) was used together with *bla* mRNA as template (15 µg of total mRNA).

observed, in contrast to the signal obtained in DMEM at 37°C, were consistent with the corresponding reductions in CAT expression (see Fig. 5).

Furthermore, primer extension analysis of the same samples, but using an oligonucleotide specific for the β-lactamase (*bla*) structural gene (carried by the *bfpT-cat* fusion plasmid pUST166), showed that expression of the *bla* gene followed a different pattern in response to the conditions tested (Fig. 6B), indicating that *bfpT* regulation by LB or ammonium was not the result of a generalized metabolic effect imposed by the growth in LB or by the ammonium concentration in DME. Thus, *bfpT* expression was environmentally regulated, as shown previously for *bfpA*.

An EPEC-specific factor is required for ammonium regulation of *bfpT* and *bfpA* expression but not for temperature regulation

In order to explore the molecular mechanism underlying transcriptional repression in the presence of ammonium, *bfpT-cat* and *bfpA-cat* transcriptional activity was determined in EPEC B171-10 and *E. coli* MC4100, carrying plasmids pUST166 (*bfpT-cat*) or pCAT232 (*bfpA-cat*). Expression of both *cat* fusions in these strains was complemented with plasmid pCS-T (see Table 1) carrying a functional *bfpT* gene expressed under the control of the *lac* promoter; this allowed the constant and non-autoregulated expression of BfpT, as can be seen in Fig. 7B. These strains were grown in DMEM with or without 15 mM ammonium sulphate at 37°C, and samples were collected at an OD₆₀₀ of 1.4 to determine CAT activity.

As shown in Fig. 7A, expression of *bfpT* or *bfpA* in the non-EPEC strain (*E. coli* MC4100) was not repressed,

regardless of the ammonium concentration, indicating that ammonium did not modulate BfpT activity directly. In contrast, expression of both genes in the EPEC pEAF- strain, B171-10, was reduced by about 80%, similar to that observed in the EPEC wild-type strain (see Fig. 5B). This result implied that the negative effect on BfpT activity or on the activation of the *bfpT* and *bfpA* promoters exerted by the addition of ammonium to DMEM required a *trans*-acting factor encoded in the EPEC chromosome, but not in the non-EPEC strain. In contrast, when the same strains were grown in DMEM at 29°C, the expression of both genes was reduced in either EPEC B171-10 or *E. coli* MC4100, indicating that a common *E. coli* global regulator or mechanism is involved in temperature regulation (Fig. 7A).

Effect of iron, pH and osmolarity on *bfpA* and *bfpT* expression

It has been shown recently that the secretion of EspA, EspB and other EPEC-secreted proteins is affected by environmental conditions (Kenny *et al.*, 1997b). Secretion was maximal at 37°C, pH 7 and physiological osmolarity (0.11 M) and required 0.25 mM concentrations of iron. In addition, it was repressed in the presence of ammonium, at lower or higher temperatures and upon growth in LB (Kenny *et al.*, 1997b). As some of these conditions resemble those found to regulate *bfpA* expression (Puente *et al.*, 1996), it has also been suggested that common effectors, such as those encoded by the *bfpTVW/per* operon, regulate fimbrial expression and protein secretion at the transcriptional level (Kenny *et al.*, 1997b). By measuring the CAT activity of wild-type EPEC (B171-8) carrying plasmids pUST166 (*bfpT-cat*) or pCAT232 (*bfpA-cat* fusion),

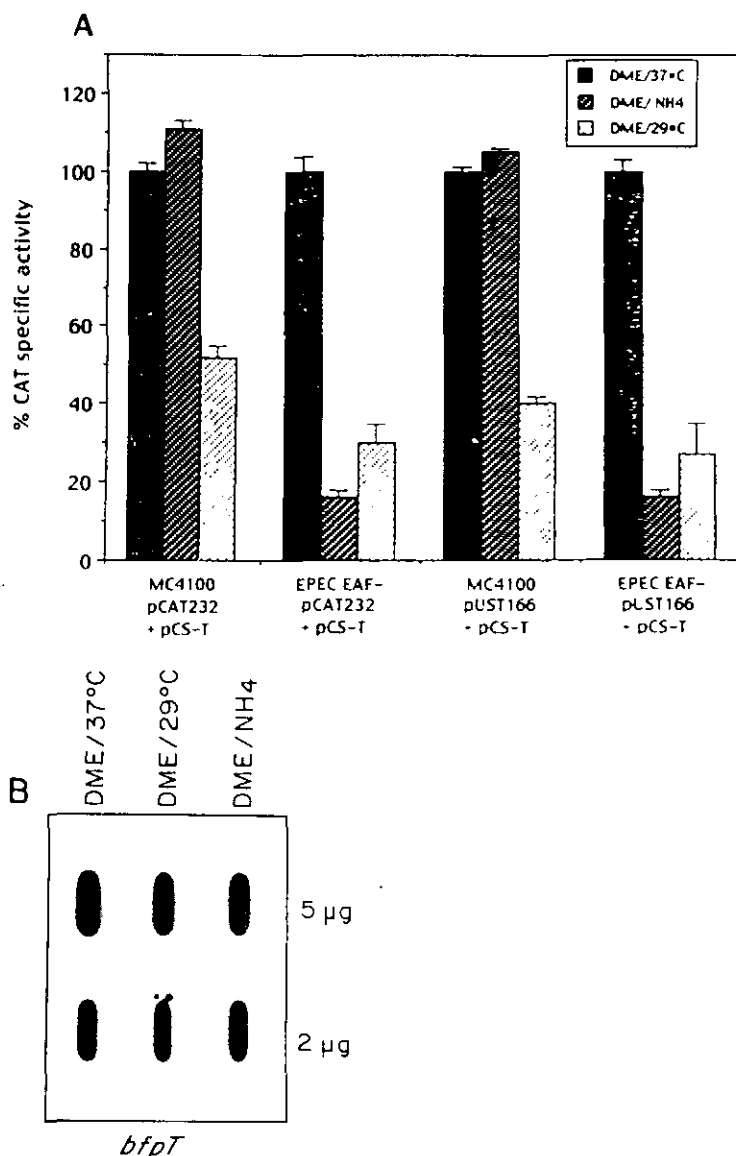


Fig. 7. An EPEC background is required for ammonium regulation but not for low-temperature regulation of *bfpA* and *bfpT* expression.

A. EPEC strain B171-10 (a B171-8 derivative cured for the EAF plasmid) carrying pCS-T (a pMPM-K3 derivative carrying the *bfpT* gene) plus either pCAT232 (carrying a *bfpA*-*cat* fusion) or pUST166 (carrying a *bfpT*-*cat* fusion) and *E. coli* K-12 strain MC4100/pCS-T harbouring either pCAT232 or pUST166 were grown in DMEM at 29°C and 37°C, or in DMEM plus 15 mM ammonium sulphate at 37°C. CAT specific activity was determined after 9 h ($OD_{600} = 1.4$) of growth and plotted as the percentage of CAT activity relative to either *bfpA*-*cat* or *bfpT*-*cat* in DMEM at 37°C.

B. Hybridization of *bfpT*-specific DNA probes to RNA isolated from strain B171-10/pCS-T + pUST166 grown in DMEM at 29°C and 37°C, or in DMEM plus 15 mM ammonium sulphate at 37°C. Total RNA was extracted from culture samples that were collected after 5 h, and 5 and 2 µg were loaded per slot. *bfpT* mRNA was detected using a ^{32}P -labelled DNA probe internal to the coding region of *bfpT*.

we analysed whether the non-tested conditions that regulate protein secretion also affected *bfpT* or *bfpA* expression.

The expression of the *bfpT* and *bfpA* genes was not significantly altered by changes in pH (6–8) or by iron limitation or excess in DMEM. Furthermore, the addition of 0.3M NaCl led to twofold higher expression levels of both genes (data not shown). These results indicate that all these virulence factors in EPEC do not necessarily follow the same regulatory pattern or, alternatively, that protein secretion is post-transcriptionally affected by some of these growth conditions.

Discussion

The bundle-forming pilus (BFP) is an environmental,

responsive virulence determinant of EPEC, whose production commences during the exponential phase of growth and is modulated by the ammonium concentration, growth medium and temperature (Girón *et al.*, 1991; Puente *et al.*, 1996; Ramer *et al.*, 1996).

Expression of *bfpA*, the BFP structural subunit gene, is regulated at the transcriptional level and requires the product of the *bfpT* gene, an AraC/XylS-like transcriptional activator (Tobe *et al.*, 1996). *bfpT* is the first gene of the *bfpTVW* operon (also called *per*), which has also been involved in the regulation of other virulence determinants in EPEC (Gómez-Duarte and Kaper, 1995).

In order to define the mechanisms that are involved in the environmental regulation of BFP expression and that of other virulence genes in EPEC further, we analysed

the transcriptional regulation of *bfpT*. In previous studies, the use of *cat* as a reporter system has proved to be useful in monitoring gene regulation in EPEC (Puente *et al.*, 1996; Bustamante *et al.*, 1998). In this work, the analysis of *bfpT* expression was conducted using *bfpT*-*cat* transcriptional fusions and primer extension experiments.

We determined the 5' end of the *bfpT* mRNA, which coincided with that identified for the *bfpT*-*cat* fusions. Based on these data, a conventional sigma-70-dependent promoter consensus sequence was located 5 bp upstream from the transcriptional start site (Fig. 2B).

In addition, our deletion analysis of the *bfpT* upstream region indicated that nucleotides up to position -81 were required for full activation of the *bfpT* promoter (Fig. 1); when the upstream sequence was shortened down to position -54, which still contained the promoter, only 4% of full activity was obtained (Fig. 1). These results were an indication that the sequence downstream from position -81 contains all the *cis*-acting DNA elements that mediate *bfpT* expression. This region consists of an AT-rich tract, which shows direct and inverted repeats (Fig. 2C). Sequences of this kind have been implicated in the regulation of genes controlled by other AraC-like proteins, such as Rns (Froehlich *et al.*, 1994; Murphree *et al.*, 1997) and CfaD (Jordi *et al.*, 1992) in *E. coli*; ToxT in *Vibrio cholerae* (Higgins and DiRita, 1994; Brown and Taylor, 1995); and VirF in *Shigella flexneri* (Tobe *et al.*, 1993).

The analysis of *bfpT*-*cat* activation in a *bfpT* mutant strain, as well as in an EPEC strain cured for the EAF plasmid or in a non-EPEC strain, complemented or not with a plasmid containing a functional *bfpT* gene, revealed that *bfpT* transcription is completely dependent on a functional BfpT protein (Fig. 3). Positive autoregulation has also been described for other genes coding for transcriptional activators, such as *papB* (Forsman *et al.*, 1989), *bvgA* (Roy *et al.*, 1990), *hpB* (Genin *et al.*, 1992), *rns* (Froehlich *et al.*, 1994), *toxT* (Brown and Taylor, 1995; Champion *et al.*, 1997), *ureR* (D'Orazio and Collins, 1995) and *marA* (Martin *et al.*, 1996). Likewise, HrpB, Rns, ToxT, UreR and MarA are members of the AraC family of transcriptional activators.

The finding that the *bfpT* gene product stimulated its own expression and that no basal expression was detected in the absence of BfpT (Figs 2B and 3) raised the question of what allows the rapid induction of the autoregulatory circuit upon the appearance of the appropriate environmental cues. It could be that very low levels of BfpT remain stable during non-inducing conditions, so that the activator is readily available to turn on the regulatory circuit under the appropriate conditions (see below).

The observation that both *bfpT* and *bfpA* are fully activated by BfpT is consistent with the presence of a common 5' upstream sequence likely to function as a binding site for BfpT. Indeed, their 5' regulatory regions share a 73% identity in a 40-bp-long AT-rich tract, located upstream

of their respective promoters, which was shown to be necessary for BfpT-dependent regulation of both genes (Fig. 2C; Bustamante *et al.*, 1998). Interestingly, in *bfpT*, this motif spans the sequence between positions -65 and -26, overlapping with the proposed -35 promoter region; while in *bfpA*, it is located two full turns (20 bp) further upstream (Bustamante *et al.*, 1998), suggesting that BfpT can activate from different locations. Moreover, the activity of a deletion in *bfpT* down to position -66, which still includes the complete homologous motif (Fig. 2C), was severely affected. In contrast, a similar deletion for *bfpA* (pCAT85) retained full activity (Bustamante *et al.*, 1998).

Comparison of the sequence absent in the *bfpT*-*cat* fusion plasmid pUST66, with respect to pUST81, and that lacking in the *bfpA*-*cat* fusion plasmid pCAT77, with respect to pCAT85 (Bustamante *et al.*, 1998), showed that the sequence motif GAAAAATAT (positions -75 to -67) in *bfpT* is almost identical to the sequence GAAATA-TAT (positions -83 to -75) in *bfpA* (Fig. 2C; Bustamante *et al.*, 1998). This observation suggests that this motif is important in gene activation, as there are significant differences in activity between each pair of plasmids (Fig. 1; Bustamante *et al.*, 1998). Alternatively, the rest of the homologous region might also be bound by additional factors, such as those involved in negative regulation. The significance of these observations in the interaction of BfpT with the regulatory regions of *bfpA* and *bfpT* and in promoter activity is a matter of our current research. In this respect, the detailed definition of the BfpT binding site by footprinting or gel shift assays has become rather challenging, as overexpression and purification of this protein has been particularly difficult (Bustamante *et al.*, 1998).

bfpT activation started early during growth and was sustained throughout the growth curve, as revealed by experiments with *bfpT*-*cat* fusions, RNA slot blots and primer extension (Fig. 4A and C; data not shown). In contrast, *bfpA* expression occurs mainly during mid-exponential phase and is turned off at early stationary phase (Fig. 4B and C; Puente *et al.*, 1996). The molecular basis for this phenomenon is currently under investigation.

On the other hand, as demonstrated for *bfpA* (Puente *et al.*, 1996), *bfpT* expression was also repressed during growth in LB and in the presence of ammonium (Figs 5 and 6). Interestingly, our studies were indicative that ammonium repression was exerted by a *trans*-acting element that was only present or functional in EPEC, as ammonium regulation was not observed in a non-EPEC background (Fig. 7A). It is still unknown whether this putative negative effector controls *bfpT* and *bfpA* transcription by binding directly to their regulatory regions or by interacting with BfpT. This study has also been undertaken in our laboratory. Ammonium regulation of virulence factors in enteric bacteria has not been studied extensively;

however, it has been suggested that there is a gradient of ammonium concentration along the intestinal tract that might influence the expression of virulence factors. Thus, the apparent preferred colonization of the proximal small intestine by EPEC seems to correlate with the lowest ammonium concentration in this region (Puente *et al.*, 1996; Edwards and Puente, 1998). In contrast, porcine ETEC preferentially colonizes the distal small intestine, correlating with the fact that its 987P fimbria is upregulated by ammonium (Edwards and Schifferli, 1997).

Transcription of the *bfpA* and *bfpT* genes also exhibited temperature regulation: for example, at 29°C and 39°C, both genes were repressed (Fig. 5C). Moreover, their expression was reduced at 29°C irrespective of the *E. coli* background, even under the constitutive expression of BfpT (Fig. 7B). In this respect, the transition from ambient low temperatures to body temperature has been correlated with dramatic changes in the expression of virulence determinants in several microorganisms (Mekalanos, 1992). Expression of genes coding for certain pili and virulence factors that are activated by AraC-related proteins is negatively thermoregulated by the ubiquitous H-NS DNA-binding protein (Jordi *et al.*, 1992; Tobe *et al.*, 1993; Nataro *et al.*, 1994; Edwards and Schifferli, 1997; Murphree *et al.*, 1997), which might also regulate *bfpT* and *bfpA* expression by blocking transcription from their promoters.

The results presented here show that *bfpT* and *bfpA* expression is also influenced by additional regulatory elements only present in EPEC (Fig. 7A). In this context, it still remains to be tested whether this is the case for the expression of other virulence determinants, such as the intimin and Esp proteins, which have also been proposed to be regulated by the *bfpTVW(per)* locus and in response to some of the conditions that regulate *bfpT* and *bfpA* expression (Gómez-Duarte and Kaper, 1995; Kenny *et al.*, 1996; 1997a; Knutton *et al.*, 1997). In contrast, pH, osmolarity and iron concentration have a different effect on *bfpT* and *bfpA* than on Esp secretion (data not shown), suggesting that there are both common and differing modes of regulation for virulence determinants in EPEC.

As mentioned previously, it has been proposed that the *bfpTVW(per)* operon determines the co-ordinate regulation of virulence factors in EPEC (Gomez-Duarte and Kaper, 1995; Tobe *et al.*, 1996). As a member of the AraC/XylS family of transcriptional regulators, this role for BfpT is not surprising. However, the putative products of *bfpV(perB)* and *bfpW(perC)* do not show clear homology with other known bacterial regulators, so their function in gene regulation is still unclear. There is the possibility, however, that they conform to a regulatory complex or cascade that participates under environmental conditions not so far tested or that regulates the expression of other

Table 1. Strains and plasmids used.

Strain or plasmid	Description	Reference or source
B171-8	EPEC O111:NM containing the EAF plasmid (80 kb); cryptic plasmid (3 kb)	Puente <i>et al.</i> (1996)
B171-T::Gm ^r	EPEC <i>bfpT</i> ::Gm ^r mutant, derived from B171-8	Tobe <i>et al.</i> (1996)
B171-10	EAF-minus derivative of B171-8	Bustamante <i>et al.</i> (1998)
MC4100	<i>E. coli</i> K-12 derivative laboratory strain	Casadaban (1976)
pKK232-8	pBR322 derivative containing a promoterless chloramphenicol acetyltransferase (<i>cat</i>) gene	Brosius (1984)
pCAT232	pKK232-8 derivative containing a <i>bfpA-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -232 to +36	Puente <i>et al.</i> (1996)
pWKS130	pSC101 derivative low-copy-number cloning vector (Km ^r)	Wang and Kushner (1991)
pBTA-BGL3	pWKS130 derivative carrying the 7.0 kb <i>Bgl</i> III EAF fragment containing the <i>bfpTVW</i> locus	Tobe <i>et al.</i> (1996)
pBTA-BH1	pWKS130 derivative carrying the 3.9 kb <i>Bam</i> HI EAF fragment containing the <i>bfpTVW</i> locus	Tobe <i>et al.</i> (1996)
pMPM-K3	p15A derivative low-copy-number cloning vector (Km ^r)	Mayer (1995)
pCS-T	pMPM-K3 derivative carrying the <i>bfpT</i> gene, expressed under the <i>tac</i> promoter	Sánchez-SanMartín <i>et al.</i> , unpublished results
pUST3800	pKK232-8 derivative containing the <i>bfpT-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -3800 to +69	This study ^a
pUST718	<i>bfpT-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -718 to +69	This study
pUST302	<i>bfpT-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -302 to +69	This study
pUST258	<i>bfpT-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -258 to +69	This study
pUST166	<i>bfpT-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -166 to +69	This study
pUST156	<i>bfpT-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -156 to +69	This study
pUST128	<i>bfpT-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -128 to +69	This study
pUST102	<i>bfpT-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -102 to +69	This study
pUST81	<i>bfpT-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -81 to +69	This study
pUST66	<i>bfpT-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -66 to +69	This study
pUST54	<i>bfpT-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -54 to +69	This study

a. The coordinates for each transcriptional fusion plasmid are indicated with respect to the *bfpT* transcriptional start site.

genes involved in pathogenesis, or both. In this scenario, BfpT could be determining the initial activation and further modulation of various events, allowing EPEC to express virulence factors at the appropriate place and time by interpreting and integrating the environmental signals that mark the initial and ideal site of intestinal colonization (Edwards and Puente, 1998).

Experimental procedures

Bacterial strains and growth conditions

The strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Luria–Bertani (LB) broth (Sambrook *et al.*, 1989) or Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), containing glucose (0.45% w/v) and L-glutamine (584 mg l⁻¹), but without sodium pyruvate (Gibco BRL Life Technologies) and supplemented with 1% LB, were used for cultures at 37°C, except where indicated. To monitor the influence of ammonium, the medium was modified by the addition of 3, 6, 10, 15 or 20 mM ammonium sulphate. Variations in pH were obtained by buffering DMEM with MOPS at 0.1 M and then adjusting the pH to different values by the addition of NaOH or HCl. To vary the osmolarity, strains were grown in DMEM containing 0.2, 0.3 or 0.4 M NaCl. Low-iron medium consisted of DMEM containing 125 mM 2,2 dipyridyl (Sigma Chemical), and high-iron medium was obtained by the addition of 0.25 or 1 mM FeCl₃. When necessary, ampicillin or kanamycin (Sigma Chemical) were added to the media to a concentration of 100 or 25 µg ml⁻¹ respectively.

Test cultures were started by concentrating the bacteria from an overnight culture in LB at 37°C and resuspending the bacterial pellet in PBS, pH 7.4, to an OD₆₀₀ of 1. Fifty millilitres of a 50-fold dilution of this suspension, in LB or DMEM, was incubated in a shaking water bath at 200 r.p.m. (Gyromax 902; Amerex Instruments) at the indicated temperatures.

Samples were collected every hour in order to determine OD₆₀₀ and CAT activity (Fig. 4A). As maximal accumulation of CAT activity was consistently being obtained towards the onset of the stationary phase of growth, for convenience most experiments were performed with cells grown up to an OD₆₀₀ of 1.2, which corresponded to 7–8 h of growth in DMEM or to 6–7 h of growth in LB. Where indicated, samples for RNA extraction (for use in primer extension and slot-blot experiments) were also collected.

DNA manipulations and sequence analysis

All DNA manipulations were performed using standard genetic and molecular techniques (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Plasmid DNA was purified using a Qiagen kit. Restriction and DNA-modifying enzymes were obtained from Boehringer Mannheim or Gibco BRL and used according to the manufacturer's instructions. The oligonucleotides used for amplification by PCR and for primer extension were synthesized by Bio-Synthesis or at our Oligonucleotide Synthesis Facility. PCR reactions were performed in a 100 µl volume using AmpliTaq (Perkin-Elmer) according to the manufacturer's instructions. Radiolabelled nucleotides [α -³²P]-ATP

(6000 Ci mmol⁻¹) were purchased from Du Pont (NEN Research Products).

Double-stranded DNA sequencing of the *bfpT* upstream region was carried out by the dideoxy-chain termination procedure, using a Thermo Sequenase cycle sequencing kit according to the manufacturer's instructions (Amersham Life Science); purified DNA from plasmids pBTA-BH1, pBTA-GL3 (Tobe *et al.*, 1996) or from the pUST fusion series (Fig. 1A) was used as template.

Construction of *bfpT*–*cat* transcriptional fusions

In order to generate *bfpT*–*cat* transcriptional fusions to monitor *bfpT* expression during growth under different conditions, ≈240 bp of the *bfpT* 5' upstream region was amplified by PCR. The following primers were used: an M13 reverse primer included in pBTA-BH1 (a pWKS130 derivative carrying a 3.9 kb *Bam*HI EAF fragment, containing the *bfpTVW* locus) and primer TAFCAT-HD3, which spans bases +32 to +59 from the *bfpT* translation initiation codon and creates a *Hind*III site.

The resulting PCR-amplified fragment was digested initially with *Hind*III. In order to generate plasmid pUST166 (Fig. 1A), this fragment was fully digested with *Bam*HI and then cloned into *Bam*HI–*Hind*III-digested pKK2332-8. To generate plasmids pUST102 and pUST54, the fragment was fully digested with *Hae*III and *Dra*I and then cloned into *Hind*III–*Sma*I-digested pKK2332-8. This vector contains a promoterless chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) gene (Pharmacia LKB Biotechnology).

In order to generate plasmids pUST156, -128, -81 and -66, the same procedure was followed, but the M13 reverse primer was replaced by primers UBfpT183F, TAFCAT155 (which creates a *Bam*HI site), UBfpT81F and UBfpT66F, which map at positions –164 to –184, –147 to –168, –88 to –108 and –81 to –93, respectively, upstream of the putative translation initiation codon.

In order to generate larger *bfpT*–*cat* transcriptional fusions, a 7 kb *Xba*I/*Sal*I fragment from pBTA-BGL3 (Table 1), containing the *bfpTVW* locus, was digested with *Bam*HI. The resulting 5.2 kb fragment was fully digested with *Eco*RV, *Pvu*II, *Sty*I or *Fsa*I, and then cloned into *Bam*HI–*Sma*I-digested pUST166 in order to generate plasmids pUST3800, -718, -302 and -258 (Fig. 1A) respectively.

CAT assay

The chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assay was performed as described previously (Puente *et al.*, 1996), with slight modifications. To prepare crude extracts, cell samples were collected by centrifugation (16 000 × g) and then washed with 1 ml of TDTT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, and 30 µM DL-dithiothreitol). The bacterial pellet was resuspended in 500 µl of TDTT buffer and sonicated on ice until it was clear. Intact cells and debris were eliminated by centrifugation (16 000 × g) for 15 min at 4°C, and the supernatants were transferred to clean microfuge tubes.

For the CAT assay, 5 µl of each extract, instead of 10 µl, was added in duplicate to a 96-well ELISA plate, followed by 200 µl of the reaction mixture containing 1 mM DNTB [5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)] (Boehringer Mannheim)/

0.1 mM acetyl-CoA (Pharmacia Biotech)/0.1 mM chloramphenicol (Sigma Chemical) in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8. Changes in absorbance at 410 nm were read and recorded every 5 s for 3 min, using a scanning autoreader and microplate workstation, Ceres 900 C and the KC3 software (Bio-Tek Instruments) set in the kinetics mode. The activities were obtained by interpolation with a standard curve, which encompassed purified chloramphenicol acetyltransferase (Sigma Chemical) concentrations of 0–2500 U ml⁻¹.

Protein concentration of the cell extracts used in the CAT assay was determined using a protein assay kit (Pierce). These values were used to calculate the CAT specific activity. BSA served as the protein standard. Each value given represents the average activity obtained from at least three independent experiments.

Primer extension analysis

Total RNA was isolated from culture samples collected after 4–5 h of exponential growth in DMEM (0.45%) at 37°C (OD₆₀₀ = 0.6–0.8), at which most transcriptional activity was observed (Fig. 4). An RNeasy kit (Qiagen) was used according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration and quality were determined by measuring the A₂₆₀ and A₂₈₀. Primer extension reactions were performed by modifying the procedure reported by Barrios *et al.* (1995). Synthetic oligonucleotides BFPT351R (5'-GTGTATTCGGTGAATTCTTTCTTG-3') and SeqCAT1 (5'-CGGTGGTATATCCAGTGAT-3'), which are complementary to the *cat* or *bfpT* coding regions, respectively, were used to determine the 5' end of the mRNA transcripts originated from the *bfpT*-*cat* fusions and the *bfpT* wild-type gene respectively. Oligonucleotides were end-labelled with [γ -³²P]-dATP using T4 polynucleotide kinase and annealed with 5 or 15 μ g of total RNA in 0.2 M NaCl–0.03 M Tris-HCl (pH 7.5), by heating for 3 min at 90°C and then cooling slowly to 42°C. The reverse transcription reactions were performed at 45°C for 1 h with 10 U of avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase enzyme (Boehringer Mannheim) in AMV buffer containing 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.27 mM dNTPs (each) and 50 U of RNase inhibitor (Boehringer Mannheim). The extension products were purified and concentrated using a microcon-10 concentrator (Amicon), according to the specifications of the manufacturer. Sequence ladders were generated with the same oligonucleotide primers using pUST166 (carrying the *bfpT*-*cat* wild-type fusion) and pBTA-BHI (containing the *bfpT* wild-type gene) as the DNA templates. The products were denatured by heating to 95°C for 5 min in loading buffer. The extension products were resolved by electrophoresis through an 8% polyacrylamide/7 M urea/TBE sequencing gel.

Slot-blot hybridization

RNA slot-blot hybridization was performed on nylon membranes (Boehringer Mannheim), in which 2 or 5 μ g of denatured total RNA was fixed per slot, using the PR600 slot-blot apparatus (Hofer Scientific Instruments), according to the manufacturer's instructions. Hybridization with ribosomal RNA was performed as a control on the slots to ensure uniform RNA transfer and retention on the blot (not shown). DNA probes

internal to the coding region for each gene were generated by PCR amplification from the EAF plasmid for *bfpA* or *bfpT*, or from pKK232-8 DNA for *cat*. DNA fragments were labelled with [α -³²P]-dCTP using a random primer kit (Amersham Life Sciences). Prehybridization and hybridization were carried out at 42°C for 4 h and 18 h, respectively, in 50% formamide/6 \times SSC/2 \times Denhardt's solution/200 mg ml⁻¹ salmon sperm DNA (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). The filters were washed with 0.2 \times SSC/0.1% SDS, and then exposed to X-ray film for 24 h.

Acknowledgements

We particularly thank Victor H. Bustamante, Claudia Sánchez, Enrique Morett and Susana López for helpful discussions. We also thank Francisco Santana for technical assistance. Y.M.-L. was supported by a PhD fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico (no. 93833) and by the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, where he was on leave as an Associate Scientist. This work was supported by grants from the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN-208095) and from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico (1027P-N).

References

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., *et al.* (1987) *Currents Protocols in Molecular Biology*. New York: Green Publishing Associates and John Wiley and Sons.
- Barrios, H., Fischer, H.M., Hennecke, H., and Morett, E. (1995) Overlapping promoters for two different RNA polymerase holoenzymes control *Bradyrhizobium japonicum* *nifA* expression. *J Bacteriol* **177**: 1760–1765.
- Brosius, J. (1984) Plasmid vector for the selection of promoters. *Gene* **27**: 151–160.
- Brown, R.C., and Taylor, R.K. (1995) Organization of *tcp*, *acf*, and *toxT* genes within a ToxT-dependent operon. *Mol Microbiol* **16**: 425–439.
- Bustamante, V.H., Calva, E., and Puente, J.L. (1998) Analysis of the promoter and *cis*-acting elements involved in the BfpT-dependent expression of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 3013–3016.
- Caron, J., Coffield, L.M., and Scott, J.R. (1989) A plasmid-encoded regulatory gene, *rns*, required for expression of the CS1 and CS2 adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 963–967.
- Casadaban, M. (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**: 541–555.
- Champion, G.A., Neely, M.N., Brennan, M.A., and Dirlita, V.J. (1997) A branch in the ToxR regulatory cascade of *Vibrio cholerae* revealed by characterization of *toxT* mutant strains. *Mol Microbiol* **23**: 323–331.
- Cravioto, A., Gross, R., Scotland, S., and Rowe, B. (1979) An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* **3**: 95–99.
- D'Orazio, S.E.F., and Collins, C.M. (1995) UreR activates transcription at multiple promoters within the plasmid-encoded

- urease locus of the Enterobacteriaceae. *Mol Microbiol* **16**: 145–155.
- Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., and Finlay, B.B. (1997) Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol* **5**: 109–114.
- Edwards, R.A., and Puente, J.L. (1998) Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol* **6**: 282–287.
- Edwards, R.A., and Schifferli, D.M. (1997) Differential regulation of *fasA* and *fasH* expression of *Escherichia coli* 987P fimbriae by environmental cues. *Mol Microbiol* **25**: 797–809.
- Elliott, S.J., Wainwright, L.A., McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Deng, Y., Lai, L.C., *et al.* (1998) The complete sequence of the locus enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**: 1–4.
- Forsman, K., Goransson, M., and Uhlin, B.E. (1989) Auto-regulation and multiple DNA interactions by a transcriptional regulatory protein in *E. coli* pili biogenesis. *EMBO J* **8**: 1271–1279.
- Foubister, V., Rosenshine, I., Donnenberg, M.S., and Finlay, B. (1994a) The *eaeB* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is necessary for signal transduction in epithelial cells. *Infect Immun* **62**: 3038–3040.
- Foubister, V., Rosenshine, I., and Finlay, B.B. (1994b) A diarrhoeal pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) triggers a flux of inositol phosphates in infected epithelial cells. *J Exp Med* **179**: 993–998.
- Froehlich, B., Husmann, L., Caron, J., and Scott, J.R. (1994) Regulation of *rms*, a positive regulatory factor for pili of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**: 5385–5392.
- Gallegos, M.T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., and Ramos, J.L. (1997) AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 393–410.
- Genin, S., Gough, C.L., Zischek, C., and Boucher, C.A. (1992) Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Microbiol* **16**: 3065–3076.
- Girón, J.A., Ho, A.S., and Schoolnik, G.K. (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**: 710–713.
- Gómez-Duarte, O.G., and Kaper, J.B. (1995) A plasmid encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**: 1767–1766.
- de Haan, L.A.M., Willshaw, G.A., van der Zeijst, B.A.M., and Gaastra, W. (1991) The nucleotide sequence of a regulatory gene present on a plasmid in an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain of serotype O167:H5. *FEMS Microbiol Lett* **67**: 341–346.
- Higgins, D.E., and DiRita, V.J. (1994) Transcriptional control of *toxT*, a regulatory gene in the ToxR regulon of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **14**: 17–29.
- Jarvis, K.G., Girón, J.A., Jerse, A.E., McDaniel, T.K., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1995) Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a specialized secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7996–8000.
- Jordi, B.J., Dagberg, B., de Haan, L., Hamers, A.M., van der Zeijst, B.A., Gaastra, W., *et al.* (1992) The positive regulator CfaD overcomes the repression mediated by the histone-like protein H-NS (H1) in the CFA/I fimbrial operon of *Escherichia coli*. *EMBO J* **11**: 2627–2632.
- Kaper, J.B. (1998) EPEC delivers the goods. *Trends Microbiol* **6**: 169–173.
- Kenny, B., and Finlay, B. (1995) Secretion of proteins by enteropathogenic *Escherichia coli* which mediate signaling in host epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7991–7995.
- Kenny, B., Lai, L.C., Finlay, B., and Donnenberg, M.S. (1996) EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol Microbiol* **20**: 313–323.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A., and Finlay, B.B. (1997a) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**: 511–520.
- Kenny, B., Abe, A., Stein, M., and Finlay, B. (1997b) Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* **65**: 2606–2612.
- Klaasen, P., and de Graaf, F.K. (1990) Characterization of FapR, a positive regulator of expression of the 987P operon in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **4**: 1779–1783.
- Knutton, S., Adu-Bobie, J., Bain, C., Phillips, A.D., Dougan, G., and Frankel, G. (1997) Down-regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion. *Infect Immun* **65**: 1644–1652.
- Knutton, S., Baldini, M.M., Kaper, J.B., and McNeish, A.S. (1987) Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Infect Immun* **55**: 78–85.
- Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M.J., Nisan, I., Neves, B.C., Bain, C., *et al.* (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* **17**: 2166–2176.
- Lai, L.C., Wainwright, L.A., Stone, K.D., and Donnenberg, M.S. (1997) A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. *Infect Immun* **65**: 2211–2217.
- Manjarrez-Hernandez, H.A., Baldwin, T.J., Aitken, A., Knutton, S., and Williams, P.H. (1992) Intestinal epithelial cell protein phosphorylation in enteropathogenic *Escherichia coli* diarrhoea. *Lancet* **339**: 521–523.
- Martin, R.G., Jair, K.W., Wolf, Jr, R.E., and Rosner, J.L. (1996) Autoactivation of the *marRAB* multiple antibiotic resistance operon by MarA transcriptional activator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 2216–2223.
- Mayer, M.P. (1995) A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**: 41–46.
- Mekalanos, J.J. (1992) Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* **174**: 1–7.
- Murphree, D., Froehlich, B., and Scott, J.R. (1997) Transcriptional control of genes encoding CS1 pili: negative regulation by a silencer and positive regulation by Rns. *J Bacteriol* **179**: 5736–5743.

- Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142–201.
- Nataro, J.P., Maher, K.O., Mackie, P., and Kaper, J.B. (1987) Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **55**: 2370–2377.
- Nataro, J.P., Yikang, D., Yingkang, D., and Walker, K. (1994) AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**: 4691–4699.
- Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W., and Schoolnik, G.K. (1996) The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* **20**: 87–100.
- Ramer, S.W., Bieber, D., and Schoolnik, G.K. (1996) BfpB, an outer membrane lipoprotein required for the biogenesis of bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 6555–6563.
- Rosenshine, I., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., and Finlay, B.B. (1992) Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *EMBO J* **11**: 3551–3560.
- Rosenshine, I., Ruschkowsky, S., Stein, M., Reinscheid, D., and Finlay, B.B. (1996) A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates pseudopod formation. *EMBO J* **15**: 2613–2624.
- Roy, C., Miller, J.F., and Falkow, S. (1990) Autogenous regulation of the *Bordetella pertussis* *bvgABC* operon. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3763–3767.
- Sambrook, J., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scaletsky, I.C.A., Silva, M.L.M., and Trabulsi, L.R. (1984) Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* **45**: 534–536.
- Sohel, I., Puente, J.L., Murray, W.J., Vuopio-Varkila, J., and Schoolnik, G.K. (1993) Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes. *Mol Microbiol* **7**: 563–575.
- Sohel, I., Puente, J.L., Ramer, S.W., Bieber, D., Wu, C.-H., and Schoolnik, G.K. (1996) Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J Bacteriol* **178**: 2613–2628.
- Stone, K.D., Zhang, H.-Z., Carlson, L.K., and Donnenberg, M.S. (1996) A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol Microbiol* **20**: 325–337.
- Tobe, T., Yoshikawa, M., Mizuno, T., and Sasakawa, C. (1993) Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* of *Shigella flexneri*: activation by VirF and repression by H-NS. *J Bacteriol* **175**: 6142–6149.
- Tobe, T., Schoolnik, G.K., Soheli, I., Bustamante, V.H., and Puente, J.L. (1996) Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for transcription activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**: 963–975.
- Vuopio-Varkila, J., and Schoolnik, G.K. (1991) Localized adherence by enteropathogenic *Escherichia coli* is an inducible phenotype associated with the expression of new outer membrane proteins. *J Exp Med* **174**: 1167–1177.
- Wang, R.F., and Kushner (1991) Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**: 195–199.
- Wolff, C., Nisan, I., Hanski, E., Frankel, G., and Rosenshine, I. (1998) Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**: 143–155.