

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

00551

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Fac. Química

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Regulación transcripcional y traduccional del locus *bfpTVW* de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

QFB. Martha Guadalupe Sosa Macías

2000



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 Instituto de Biotecnología de la UNAM, en el Departamento de Microbiología Molecular, en el laboratorio de los Drs. Edmundo Calva Mercado -José Luis Puente García, bajo la dirección del Dr. José Luis Puente. Durante su realización fui becaria de CONACyT.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	12
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y METODOS.....	14
RESULTADOS.....	35
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	47
BIBLIOGRAFIA.....	52

RESUMEN

SOSA MACIAS MARTHA GUADALUPE: "Regulación transcripcional y traduccional del locus *bfpTVW* de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)". Tutor: Dr. José Luis Puente García.

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es reconocida como una de las clases de *E. coli* que causan diarrea en humanos, la cual afecta principalmente a niños menores de seis meses de edad. En su primera etapa de colonización, EPEC se adhiere a las células epiteliales produciendo el fenotipo conocido como adherencia localizada, el cual está mediado por los filamentos llamados BFP ("Bundle-forming pilus"). La subunidad formadora de estas estructuras es la proteína BfpA, cuya expresión varía en respuesta al medio de crecimiento, la temperatura y la concentración de amonio y requiere de BfpT, un miembro de la familia de reguladores transcripcionales AraC, cuyo gen está localizado 18 kb corriente abajo del gen *bfpA*, en el plásmido EAF ("EPEC Adherence Factor"). *bfpT*, junto con los genes *bfpV* y *bfpW*, forman el locus *bfpTVW* (llamado también *perABC*). Recientemente, en el laboratorio, se vio que el gen *bfpV* tiene un efecto modulador negativo sobre la expresión de *bfpA* y de *bfpT*; asimismo, otros grupos han sugerido que el producto de *bfpW* activa la expresión de los genes *eae* y *esp*, que son necesarios en etapas posteriores de colonización.

De esta manera, con el propósito de entender mejor los mecanismos involucrados en la regulación de factores de virulencia de EPEC, en este trabajo nos enfocamos a caracterizar en más detalle el locus *bfpTVW*. Para esto, analizamos construcciones conteniendo diferentes segmentos del locus fusionados al gen reportero *cat*, las cuales revelaron que sus genes forman un operón, ya que su expresión depende del promotor de *bfpT*. A este respecto, mediante un experimento de RT-PCR, determinamos que los genes del locus se transcriben en un RNA mensajero policistrónico, corroborando el resultado anterior. Asimismo, no se detectó ninguna señal de inicio de transcripción alrededor de las regiones intergénicas de este locus, sólo una señal identificada previamente en el promotor de *bfpT*. Por otro lado, utilizando diferentes sistemas de expresión, no se detectó la presencia de BfpT ni de BfpV; aun bajo el promotor T7 y marcando las proteínas radioactivamente, sólo se detectó la expresión de BfpW. Debido a lo anterior y al interés por saber si *bfpT* y *bfpV* son genes que se traducen, analizamos la expresión del locus *bfpTVW* a nivel traduccional, mediante fusiones de cada uno de estos genes al gen

reportero *lacZ*, lo cual ayudó a definir que tanto *bfpT* como *bfpV* codifican para una proteína.

De esta manera, es interesante notar que a pesar de estar coordinadamente reguladas en un operón, las dos primeras proteínas BfpT y BfpV están presentes en muy bajas cantidades en la célula, mientras que la tercera proteína, BfpW, está presente en mayor cantidad.

INTRODUCCION

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) pertenece al grupo de cepas de *E. coli* que causan diarrea en humanos, las cuales se han clasificado en las siguientes categorías: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y EPEC (Nataro y Kaper, 1998). EPEC se distingue por su habilidad para causar una histopatología característica, conocida como lesión A/E (“attaching and effacing”, pegado y destrucción), sobre la célula huésped y por su incapacidad de producir enterotoxinas o citotoxinas (Levine et al., 1978; Donnenberg et al., 1997).

EPEC fue la primera clase de *E. coli* reconocida como causa de diarrea infantil, la cual puede ser severa, no tratable por rehidratación, prolongada y letal. Actualmente es una causa muy común de diarrea en niños menores de seis meses de edad, siendo una de las bacterias enteropatógenas que más se aíslan en este grupo de edad y presentando una alta mortalidad en países en vías de desarrollo (Albert et al., 1995; Gomes et al., 1991).

Las interacciones entre EPEC y la célula huésped, que dan como resultado la lesión A/E, pueden ser divididas en tres estados: adherencia inicial, transducción de señales y adherencia íntima (Fig 1)(Donnenberg y Kaper, 1992).

Adherencia inicial

EPEC puede iniciar la colonización al adherirse al intestino delgado proximal, donde produce densas microcolonias en la superficie de las células epiteliales, fenotipo conocido como adherencia localizada (AL) (Cravito et al., 1979; Knutton et al., 1987; Vuopio-Varkila y Schoolnik, 1991). Este patrón de adherencia es considerado una propiedad común de las cepas clásicas de EPEC, la cual es observada también *in vitro* al incubar esta bacteria con células epiteliales en cultivo (Cravito et al., 1979; Rothbaum et al., 1983; Nataro et al., 1987). El fenotipo de AL se asocia a la presencia de un plásmido de aproximadamente 80 kb, llamado EAF (“EPEC Adherence Factor”). Cepas de EPEC curadas de este plásmido no generan AL, ni causan diarrea en humanos (Levine y Edelman, 1984; Nataro et al., 1985).

El plásmido EAF contiene el operón *bfp*, cuyos genes codifican para las proteínas encargadas de producir la fimbria conocida como BFP (“Bundle-forming pilus”). Esta fimbria consiste de filamentos delgados y largos que se agrupan formando ramilletes y se entrelazan dando lugar a una estructura semejante a una red que mantiene unidas a las bacterias, permitiendo así la formación de las microcolonias vistas en la AL. La subunidad formadora de estas estructuras es una proteína llamada BfpA de 193 aminoácidos, cuyo gen *bfpA* encabeza

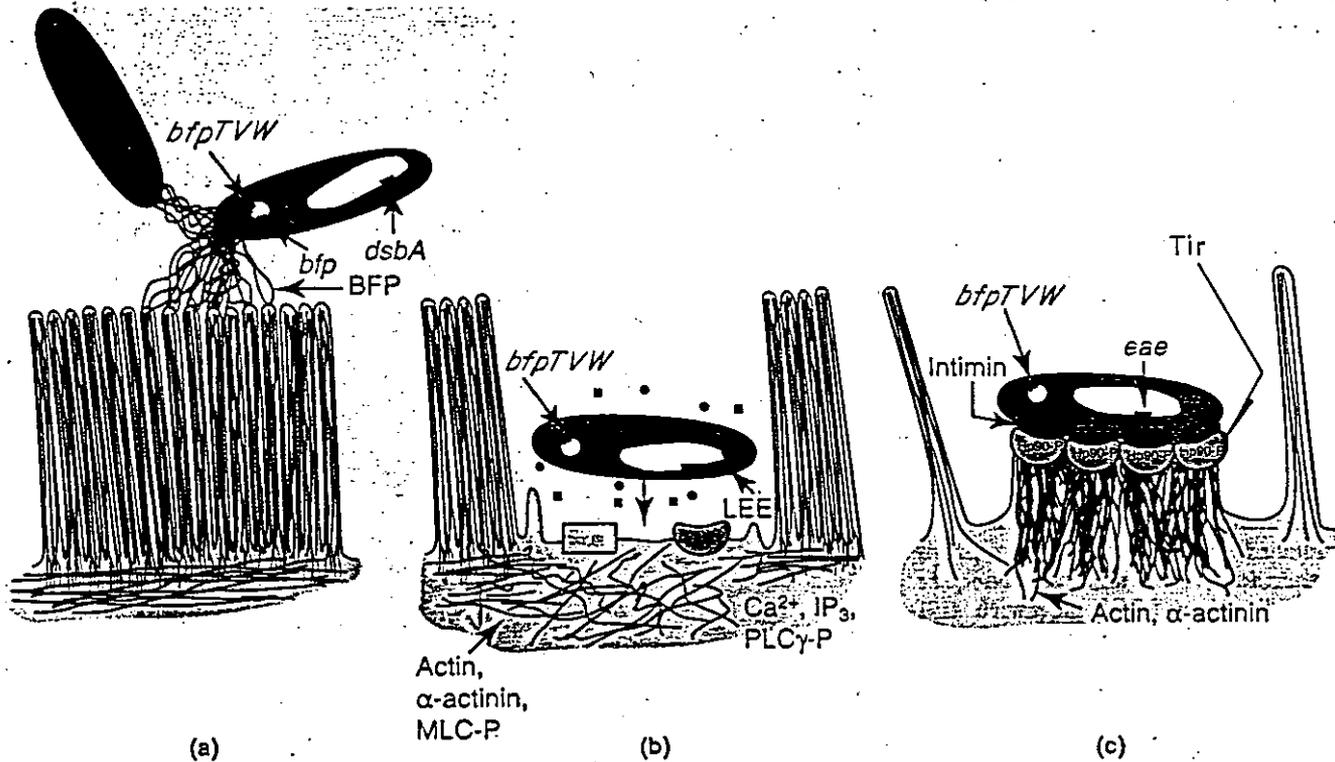


Fig. 1 Modelo de la interacción de EPEC con la célula huésped y formación de la lesión A/E. (a) La adherencia inicial de EPEC a las células epiteliales es mediada por los BFP ("Bundle-forming pilus") sintetizados por el operón *bfp*, cuya expresión es dependiente del locus *bfpTVW*, ambos grupos de genes están localizados en el plásmido EAF. (b) La transducción de señales está a cargo de las proteínas secretadas por EPEC, [EspA (círculos) y EspB (cuadros)], codificadas en la región LEE del cromosoma de la bacteria, las cuales incluyen aumento de Ca^{2+} e inositol fosfato intracelular, la fosforilación de algunas proteínas del huésped, entre otras señales, así como la inducción de reareglos de actina y otras proteínas del citoesqueleto y la destrucción de los microvellosidades intestinales. (c) La adherencia íntima es mediada por la intimina, el producto del gen *eae*, cuyo receptor en la célula huésped es Tir, proteína de origen bacteriano que es translocada a la membrana externa de la célula huésped donde es fosforilada. Debajo de esta unión; ocurre la acumulación de filamentos de actina los cuales forman una estructura semejante a una copa o pedestal. A toda esta serie de cambios que la bacteria produce sobre la célula huésped se le conoce como fenotipo A/E (Domenberg et al., 1997; Kaper, 1998; Nataro y Kaper, 1998).

el operón *bfp* (Fig. 2A) (Girón et al., 1991; Sohel et al., 1993; 1996; Stone et al., 1996).

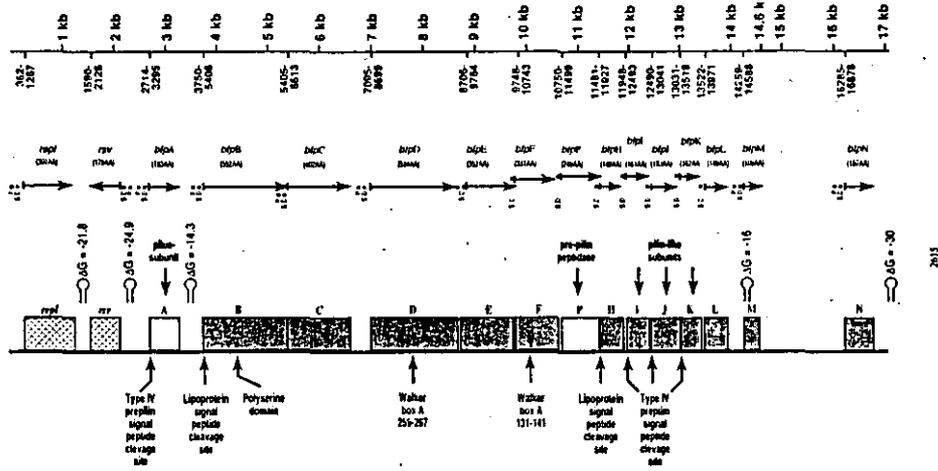
La secuencia de BfpA presenta características típicas de las proteínas que forman la familia de los pilis tipo IV (Sohel et al., 1993). Muchos de los miembros de esta familia son proteínas que, en diferentes bacterias patógenas, tienen un papel importante en la adherencia de la bacteria para la colonización de los tejidos. Los pilis tipo IV se han encontrado en diferentes bacterias Gram-negativas que causan enfermedades en humanos o animales, como *Vibrio cholerae*, *Neisseria* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella bovis* y *Dichelobacter nodosus*, entre otras (Strom y Lory, 1993).

Recientemente se han identificado 13 genes localizados corriente abajo de *bfpA*, los cuales están involucrados en la biogénesis del BFP (Fig. 2A) (Sohel et al., 1996; Stone et al., 1996). La mayoría de las proteínas deducidas de estos genes tienen homología con proteínas involucradas en la biogénesis de pilis tipo IV en otras bacterias. El gen *bfpB*, localizado enseguida de *bfpA*, codifica para una lipoproteína de membrana externa que podría estar involucrada en el anclaje de los pilis en la superficie de la bacteria (Ramer et al., 1996); otro gen de este grupo, llamado *bfpP*, codifica para una peptidasa encargada del procesamiento de BfpA (Zhang et al., 1994). Además, para mantener a BfpA en una conformación estable, se requiere de la enzima periplásmica DsbA (Zhang and Donnenberg, 1996).

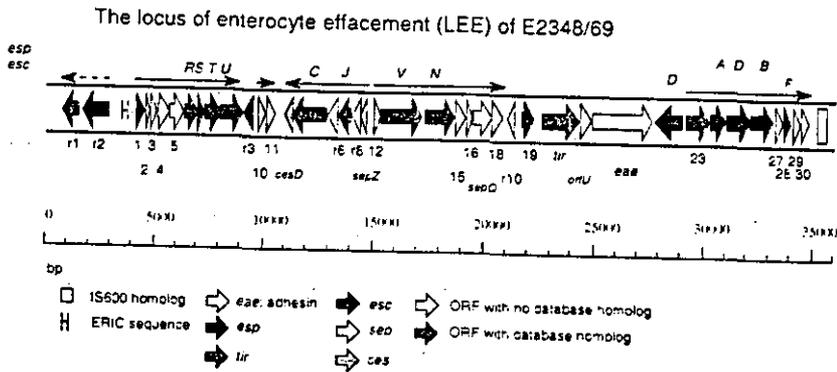
Transducción de señales

En la segunda etapa, proteínas que la bacteria secreta, codificadas por los genes *espA*, *espB* y *espD* (“EPEC secreted or signalling protein”), están involucradas en activar rutas de transducción de señales en la célula huésped (Foubister et al., 1994b; Kenny et al., 1996; Lai et al., 1997). Estos eventos se ven reflejados en el aumento en la concentración intracelular de calcio y de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) (Baldwin et al., 1991); la activación de fosfolipasa C- γ (Kenny and Finlay, 1997), proteína cinasa C (Crane and Oh, 1997) y NF- κ B (Savkovic et al., 1997); así como en la inducción de rearreglos del citoesqueleto y la destrucción de las microvellosidades intestinales (Manjarrez et al., 1992; Rosenshine et al., 1992; Foubister et al., 1994a). Estudios recientes revelaron que EspA es un componente principal de un organelo filamentoso que contribuye a la adhesión de la bacteria y que es necesario para la translocación de EspB al citoplasma de la célula huésped (Knutton et al., 1998; Taylor et al., 1998; Wolff et al., 1998). La secreción de estas proteínas depende de un sistema de secreción tipo III, codificado por los genes *esc* y *sep* (“EPEC secretion” y “Secretion of E. coli proteins”) (Jarvis et al., 1995; Elliot et al., 1998).

A)



B)



C)

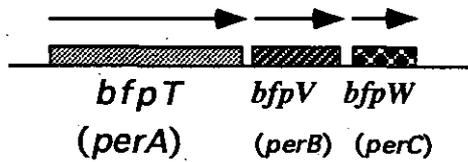


Fig. 2 Representación esquemática de los genes involucrados en la virulencia de EPEC. (a) El operón *bfp*, localizado en el plásmido EAF, contiene el gen *bfpA* que codifica para la subunidad estructural de los BFP, corriente abajo de este se encuentran los genes necesarios para la biogénesis de los pili BFP (Sohel et al., 1996). (b) Región LEE localizada en el cromosoma de EPEC, que contiene los genes: *eaeA* (intimina), *tir* (“Translocated intimin receptor”), *espA*, *espB* y *espD* (“*E. coli* secreted protein”), y los genes *esc* (“*E. coli* secretion”) que son homólogos a los componentes del sistema de secreción tipo III de otras bacterias Gram-negativas (Elliot et al., 1998) (c) Locus *bfpTVW* llamado también *perABC*, localizado en el plásmido EAF, a 6.7 kb corriente abajo del operón *bfp* (Tobe et al., 1996).

Adherencia Intima

El gen *eae* ("*E. coli* attaching and effacing") codifica para una adhesina bacteriana llamada intimina, que interacciona con Tir, una proteína de origen bacteriano que es translocada a la célula huésped donde se fosforila, funcionando de esta forma como receptor de la intimina (Rosenshine et al., 1996; Kenny et al., 1997). Debajo de la bacteria adherida, Tir promueve la acumulación de filamentos de actina y de otras proteínas del huésped, conduciendo la formación de proyecciones semejantes a copas o pedestales. Recientemente, se ha mostrado que la translocación de Tir requiere de las proteínas Esp y del sistema de secreción tipo III (Kenny et al., 1997).

Los genes involucrados en la formación de la lesión A/E (*esc*, *sep*, *esp*, *eae*, y *tir*), están codificados en una región del cromosoma de la bacteria de 35 kb, llamada LEE ("Locus for enterocyte effacement"), que constituye una isla de patogenicidad de EPEC (Fig. 2B) (Elliot et al., 1998).

Regulación de *bfpA*

Estudios sobre la regulación de *bfpA*, han revelado que éste se expresa exclusivamente durante la fase exponencial de crecimiento, en medio de cultivo de células DME (Dulbecco's modified Eagle's medium), a una temperatura de incubación de 37°C. La actividad de *bfpA* se reprime fuertemente a bajas (21°C) y altas temperaturas (41°C), así como en presencia de amonio o durante el crecimiento en medio rico (Puente et al., 1996).

La activación de *bfpA* es dependiente del activador transcripcional BfpT, el cual es suficiente para activar la expresión de *bfpA* en cepas de *E. coli* que no poseen el plásmido EAF (Tobe et al., 1996; Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados). Estudios recientes sugieren que BfpT se une directamente a la región reguladora de *bfpA*, sin embargo, la secuencia específica que reconoce BfpT no ha sido aún bien definida (Tobe et al., 1996; Bustamante et al., 1998; Martínez-Laguna et al., en prensa 1999). BfpT es una proteína de 274 aminoácidos (31.7 kDa) que pertenece a la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS, la cual incluye proteínas que regulan funciones relacionadas con patogénesis y con el metabolismo de fuentes de carbono, entre otras funciones (Gallegos et al., 1997). La región más altamente conservada de esta familia está constituida por un trecho de 99 aminoácidos, localizada en su extremo carboxilo terminal, el cual constituye el dominio de unión a DNA. En su región amino terminal no presentan homología entre ellas, y ésta les sirve para detectar señales químicas, como sucede con AraC, proteína reguladora de los

operones de arabinosa en *E. coli*, la cual contiene un dominio que detecta arabinosa y otro provee específica unión a DNA y activa la transcripción (Bustos y Schleif, 1993; Menon y Lee, 1990). Asimismo, existe otro grupo de proteínas de esta familia que contienen sólo la región carboxilo terminal, como la proteína SoxS, cuyo gen, que forma parte del regulón *soxRS*, es activado por SoxR en respuesta a estrés oxidativo, de esta forma se sobreproduce SoxS y activa la transcripción de promotores afines (Amabile-Cuevas y Demple, 1991). Varias proteínas que pertenecen a esta familia, se han involucrado como reguladores positivos de la expresión de diferentes pilis en *E. coli* y *V. cholerae*. CfaD y Rns son proteínas codificadas en un plásmido, las cuales regulan la expresión de los pilis CFA/ I y CFA/ II, respectivamente, de ETEC (Savel Koul et al., 1990; Caron et al., 1989); ToxT es una proteína codificada en el cromosoma que regula la expresión del pili tipo IV de *Vibrio cholerae* (Ogierman y Manning, 1992). Entre los miembros de esta familia, BfpT exhibe mayor homología con VirF de *Shigella flexneri*, CfaD de *E. coli* uropatógena, Rns y FapR de ETEC y AggR de EAggEC (Tobe et al., 1996). Una característica que tienen en común los genes que codifican para estas proteínas es su bajo contenido de G+C (27.6%-31.7%), comparado con la cantidad de G+C del genoma de *E. coli* y *Shigella*, que es de alrededor de 50% (Krieg and Holt, 1984). Por lo anterior, se ha propuesto que estos genes reguladores se pudieron haber originado de la misma fuente ancestral con bajo contenido de G+C (Tobe et al., 1996).

bfpT forma parte del locus *bfpTVW* (previamente identificado como locus *per*) el cual está además constituido por los genes *bfpV* (*perB*) y *bfpW* (*perC*) (Fig. 2C). Recientemente se determinó su inicio de transcripción, y al analizar su secuencia, se observó que contiene un promotor convencional dependiente de sigma 70 y un supuesto sitio de unión a ribosomas (Martínez-Laguna et al., en prensa 1999) (fig. 3). La expresión de *bfpT* sigue el mismo patrón de regulación que *bfpA*, en respuesta al medio de crecimiento, concentración de amonio y temperatura; pero a diferencia de *bfpA*, este gen se expresa durante toda la curva de crecimiento, autorregulando su expresión (Martínez-Laguna et al., en prensa 1999). Las proteínas deducidas de *bfpV* y *bfpW* son de 130 y 90 aminoácidos, con un peso molecular de 14.5 y 10.5 kDa, respectivamente. A la fecha, no se ha encontrado algún dominio particular en BfpV y BfpW que compartan con otra familia de proteínas.

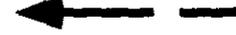
Los genes de este locus se encuentran en la misma orientación y están separados por menos de 50 pares de bases (pb) (49pb separan a *bfpT* de *bfpV* y 47 separan a *bfpV* de *bfpW*), lo cual ha sugerido que estos genes se encuentran formando un operón (Tobe et al., 1996). Asimismo, el análisis de la secuencia del locus reveló que corriente abajo de *bfpW* existe una región con el potencial de generar una estructura secundaria, la cual podría

funcionar como terminador de la transcripción (Sánchez-SanMartín; datos no publicados)
(Fig. 4).

→ UST166

TGCCGTGGATCCTTAGGGCGGTGCCATATTACGAGATAAGATCAAGCAATGACTTAAGTTATAAC -108

TGGGGCCTGAATATATAGGGGGGCAACACCTTGAAAAATATCAGTAAATTTTAAAAAAAAGCA - 43

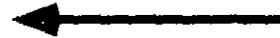


→ *bfpT* mRNA

TAAAAGTATTGATTTTACAGAGTGGCAATAAAAAATCAATAGAAAACAAACGCGCATGAAGGTG +22

-35

-10



GTTAATGCTTACATCTAAAAAAGAAATGCAGAGTTCTGAAAATAAACAAGAGGAGAATTTAGCGT +91

M L T S K K E M Q S S E N K Q E E N L A

Fig. 3 Secuencia nucleotídica de la región promotora de *bfpT*. La **G** con una flecha horizontal (*bfpT* mRNA) indica el sitio de inicio de la transcripción. Las secuencias -10 y -35 del promotor propuesto para *bfpT* se encuentran subrayadas, y el sitio de unión a ribosomas está señalado en una caja. Secuencias repetidas invertidas están indicadas por flechas horizontales abajo de la secuencia. La flecha horizontal (UST166) indica la región promotora mínima necesaria para la expresión de *bfpT* usada para la construcción del plásmido pUST166, el cual se utilizó como control positivo en el ensayo de actividad de CAT (Fig. 5). La barra mostrada abajo de la secuencia indica la región que presenta homología con la región promotora de *bfpA*.

Locus *bfpTVW*

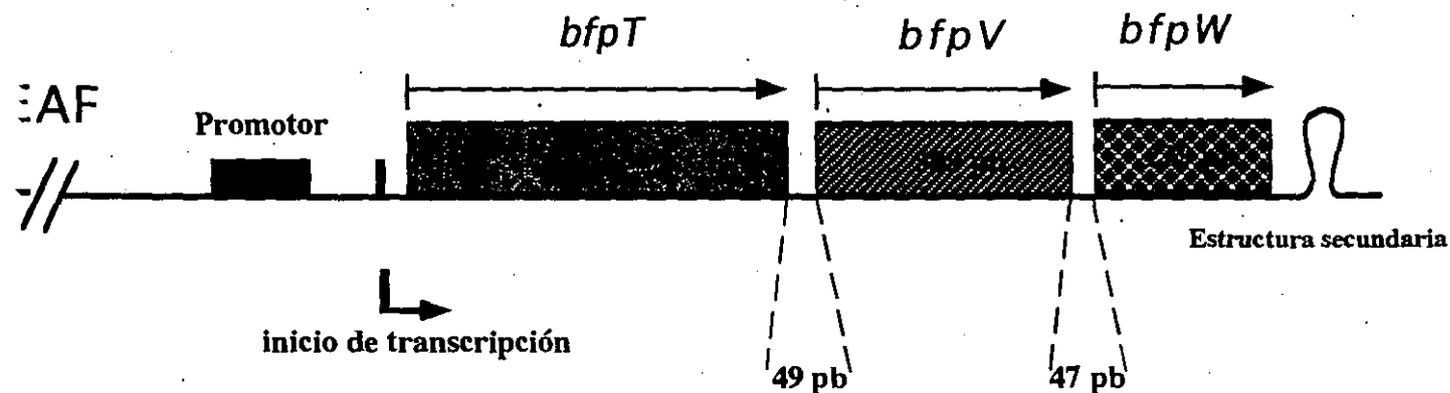


Fig. 4 Mapa del locus *bfpTVW* localizado en el plásmido EAF. Las flechas horizontales encima de cada caja indican la dirección de la transcripción de *bfpT*, *bfpV* y *bfpW*, y dentro de éstas se muestra la longitud de la región estructural de cada gen, entre las líneas punteadas se muestra la longitud de las regiones intergénicas. Corriente abajo de *bfpW* se señala una secuencia con el potencial de formar una estructura secundaria que puede funcionar como terminador de la transcripción. Además se muestra la región promotora y el sitio de inicio de transcripción de *bfpT*.

Antecedentes

En estudios realizados en nuestro laboratorio, se observó que la presencia de *bfpV* parece tener un efecto modulador negativo sobre la expresión de *bfpT* y *bfpA* (Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados; Bustamante, et al., 1998). Asimismo, el gen *bfpW* también conocido como *perC*, ha sido involucrado en la expresión de los genes *eae*, *espB* y otros que codifican para proteínas que se secretan; además de estar involucrado en regular la expresión de genes que codifican para proteínas de membrana externa de 50 y 33kDa (Gómez-Duarte and Kaper, 1995; Kenny and Finlay, 1995). También se ha reportado que el locus *bfpTVW* (*per*) puede reprimir la expresión de la intimina durante la fase estacionaria de crecimiento, mientras que activa su expresión durante el crecimiento exponencial (Knutton et al., 1997).

De esta manera, el locus *bfpTVW* podría tener un papel muy importante en coordinar la expresión de factores de virulencia de EPEC, en respuesta a diferentes condiciones ambientales, lo cual le permitiría colonizar el sitio adecuado en el intestino del huésped. Sin embargo, hasta el momento, no se sabe con certeza si el locus *bfpTVW* forma un operón y si los genes *bfpV* y *bfpW* codifican para un producto. Por tal motivo, resulta de gran relevancia para nosotros caracterizar en detalle este locus, lo que ayudará a entender mejor el mecanismo molecular por el cual se regula la expresión de genes de virulencia en EPEC.

En el presente trabajo, se determinó que los genes del locus *bfpTVW* forman un operón; además, se realizó un análisis de la expresión de este locus a nivel traduccional, con el propósito de definir si *bfpT*, *bfpV* y *bfpW* se traducen.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el mecanismo molecular que regula la expresión de factores de virulencia en EPEC.

OBJETIVO PARTICULAR

Estudiar la organización transcripcional y traduccional del locus *bfpTVW*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.-Determinar si *bfpT*, *bfpV* y *bfpW* forman un operón.
- 2.-Determinar si los genes *bfpT*, *bfpV* y *bfpW* se traducen.

MATERIALES

Cepas y plásmidos.

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla I

Tabla I. Cepas de *E. coli* y plásmidos.

Cepa/Plásmido	Descripción	Referencia
<u>Cepas</u>		
B171-8	EPEC 0111:NM, con el plásmido EAF	Puente et al 1996.
DH5 α	F' <i>lndA1 hsdR17</i> (r_+ m^+) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA</i> (NaF) <i>relA1</i> Δ (<i>lacIZYA-argF</i>) <i>U169 deoR</i> (Φ 80 <i>dlac</i> Δ (<i>lacZ</i>) M15).	Raleigh y Brent, 1989.
MC4100	F' <i>araD 139</i> Δ (<i>arg F-1 ac</i>) <i>U169 rpsL150</i> (Str') <i>relA 1 fbb 5301 deoC 1 ptsF25rbsR</i> .	Silhavy et al., 1984.
BL21 (DE3)	F' <i>ompT</i> (<i>lon</i>) <i>hsdS_B</i> (r_+ m^+); una cepa de <i>E. coli</i> B) con DE3, un profago λ , que lleva el gen de la RNA polimerasa T7.	Studier et al., 1990.
P678-54	F' <i>, thr, leu, supE, lacY, tonA, gal, mal, xyl, ara, mtl, min.</i>	Dougan y Kehoe, 1984.
<u>Plásmidos</u>		
pEAF	Plásmido de 80 kb que contienen las cepas de EPEC.	Knutton et al., 1987.
pWKS130	Vector de clonación de bajo número de copias (Km); contiene el origen de replicación de pSC101.	Wang y Kushner, 1991.
pBTA-BHI	Derivado de pWKS130 que lleva un fragmento de <i>Bam</i> HI de 3.9 kb obtenido del pEAF; el cual contiene el locus <i>bfpTVW</i> y las fases de lectura abierta 3 y 4.	Tobe et al., 1996.
pBTA-BHI-TVW	Derivado de pBTA-BHI que contiene el locus <i>bfpTVW</i> .	Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados.
pBTA-BHI-VW	Derivado del pBTA-BHI-TVW que lleva una remoción en fase de <i>bfpT</i> .	Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados.
pBTA-BHI-TW	Derivado del pBTA-BHI-TVW que lleva una remoción en fase de <i>bfpV</i> .	Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados.
pBTA-BHI-TV	Derivado del pBTA-BHI-TVW que lleva una remoción en fase de <i>bfpW</i> .	Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados.
pBTA-BHI-T	Derivado del pBTA-BHI-TVW que lleva una	Sánchez-SanMartín et

	remoción en fase de <i>bfpV</i> y <i>bfpW</i> .	al., datos no publicados.
pBTA-BHI-W	Derivado del pBTA-BHI-VW que lleva una remoción en fase de <i>bfpT</i> y <i>bfpV</i> .	Este trabajo.
pBTA-T7-TVW	Derivado del pBTA-BHI-TVW que contiene el locus <i>bfpTVW</i> a favor del promotor T7.	Este trabajo.
pBTA-T7-VW	Derivado del pBTA-BHI-VW que contiene a <i>bfpV</i> y <i>bfpW</i> a favor del promotor T7.	Este trabajo.
pBTA-T7-TW	Derivado del pBTA-BHI-TW que contiene a <i>bfpT</i> y <i>bfpW</i> a favor del promotor T7.	Este trabajo.
pBTA-T7-TV	Derivado del pBTA-BHI-TV que contiene a <i>bfpT</i> y <i>bfpV</i> a favor del promotor T7.	Este trabajo.
pBTA-T7-T	Derivado del pBTA-BHI-T que contiene a <i>bfpT</i> a favor del promotor T7.	Este trabajo.
pRS414	Vector que se utilizó para hacer fusiones traduccionales de la región reguladora de <i>bfpT</i> y diferentes longitudes del locus <i>bfpTVW</i> al gen reportero <i>lacZ</i> .	Simons et al., 1987.
pbfpT-1	Derivado del pRS414 que contiene una fusión de <i>bfpT</i> a <i>lacZ</i> , incluye 99 codones de <i>bfpT</i> .	Este trabajo.
pbfpΔT-V1	Derivado del pRS414 que contiene una fusión de <i>bfpV</i> a <i>lacZ</i> , incluye 125 codones de <i>bfpV</i> .	Este trabajo.
pbfpΔTΔV-W1	Derivado del pRS414, que contiene una fusión de <i>bfpW</i> a <i>lacZ</i> , incluye 76 codones de <i>bfpW</i> .	Este trabajo.
pKK232-8	Vector derivado del pBR322 que se utilizó para hacer fusiones transcripcionales de diferentes longitudes de la región del locus <i>bfpTVW</i> al gen reportero <i>cat</i> .	Brosius, 1984.
pUST166	Derivado del pKK232-8 que contiene una fusión de <i>bfpT</i> a <i>cat</i> , incluye la región reguladora de <i>bfpT</i> y sus primeros 14 codones.	Martínez-Laguna et al., en prensa
pbfpΔT V-cat	Derivado del pKK232-8 que contiene una fusión de <i>bfpV</i> a <i>cat</i> , incluye la región reguladora y la remoción en fase de <i>bfpT</i> y 21 codones de <i>bfpV</i> .	Este trabajo.
pbfpΔT VW-cat	Derivado del pKK232-8 que contiene una fusión de <i>bfpW</i> a <i>cat</i> , incluye la región reguladora y la remoción en fase de <i>bfpT</i> , <i>bfpV</i> y 12 codones de <i>bfpW</i> .	Este trabajo.
pbfpΔTΔV W-cat	Derivado del pKK232-8 que contiene una fusión de <i>bfpW</i> a <i>cat</i> , incluye la región reguladora de <i>bfpT</i> y la remoción en fase de <i>bfpT</i> y <i>bfpV</i> y 12	Este trabajo.

codones de *bfpW*.

pbfpV-cat	Derivado de pKK232-8 que contiene una fusión de <i>bfpV</i> a <i>cat</i> , incluye la región intergénica entre <i>bfpT</i> y <i>bfpV</i> , con 21 codones de <i>bfpV</i> .	Este trabajo.
pbfpVW-cat	Derivado de pKK232-8 que contiene una fusión de <i>bfpW</i> a <i>cat</i> , incluye la región intergénica entre de <i>bfpT</i> y <i>bfpV</i> , y entre <i>bfpV</i> y <i>bfpW</i> .	Este trabajo.
pbfpW-cat	Derivado de pKK232-8 que contiene una fusión de <i>bfpW</i> a <i>cat</i> , incluye la región intergénica entre <i>bfpV</i> y <i>bfpW</i> y 12 codones de <i>bfpW</i> .	Este trabajo
pMPM-K3	Vector de clonación (Km ^r) que contiene el origen de replicación del plásmido p15A.	Mayer, 1995.
pCS-TVW	Derivado de pMPM-K3 que contiene el locus <i>bfpTVW</i> .	Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados.
pCS-T	Derivado de pCS-TVW que lleva una remoción en fase de <i>bfpV</i> y <i>bfpW</i> .	Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados.
pMC1871	Vector que se utiliza para hacer fusiones traduccionales a <i>lacZ</i> .	Miller et al., 1972.
pRO266	Derivado del pMC1871 que contiene una fusión traduccional de <i>ompS1</i> al gen reportero <i>lacZ</i> .	Oropeza et al., 1999.

Medios de cultivo

*LB (Luria-Bertani)

Por litro de agua:

Bacto-triptona	10g
Extracto de bacto-levadura	5g
NaCl	10g
Ajustar pH a 7.5 con NaOH	

*Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Medio para el cultivo de células eucariontes, para su preparación se siguieron las recomendaciones del proveedor (Gibco BRL), se añadió sulfato de piridoxal a una concentración de 4mg/lit y 1% de LB.

***M9 1X**

Por litro de agua:

Na_2HPO_4	6 g
KH_2PO_4	3 g
NaCl	0.5 g
NH_4Cl	1 g

Ajustar pH a 7.4, filtrar y esterilizar.

***Methionine assay medium (MAM)**

Para su preparación se siguieron las recomendaciones del proveedor (DIFCO).

Soluciones y amortiguadores

***Bromuro de etidio 0.5mg/ml**

Bromuro de etidio 50 mg

Agua 100ml

Diluirlo 1:1000 para tinción de DNA en geles de agarosa o poliacrilamida.

***Solución amortiguadora (SA) de lavado**

Tris-HCl pH 7.8 50mM

DTT 30mM

***SA Z 5X**

K_2HPO_4	40.21 g
KH_2PO_4	13.8 g
NaCl	1.9 g
MgSO_4	0.61 g

Aforar a 500ml con agua y ajustar el pH a 7.0

***SA para incubación con DNAsaI 2X**

Tris pH 7.9 8mM

MgSO_4 40mM

CaCl 4mM

KCl 40mM

EDTA 2mM

***Cobranche de corrida para DNA 10X**

Ficoll 400 20%

Na₂EDTA 0.1M, pH 8

SDS (Dodecil sulfato de sodio) 1.0%

Azul de bromofenol 0.25%

Xileno cianol 0.25%

***Mezcla de corrida para electroforesis de proteínas**

Glicerol 20%

2-Mercaptoetanol 10%

SDS 4.6%

Tris-HCl pH 6.8, 0.125M

Azul de bromofenol 0.1%

***Mezcla de dNTPs**

a 1.25mM de cada nucleótido en agua

***Mezcla lítica**

NaOH 0.2N

SDS 2.0%

***Mezcla de reacción del ensayo de actividad de CAT (EAC)**

Agua	22 ml
DNTB 10 μ M	2.5 ml
Acetil Co-enzima A 5mM	500 μ l
Cloranfenicol 5mM	500 μ l

***PBS 10X**

NaCl	80.0 g
Na ₂ HPO ₄	6.1 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
KCl	2.0 g

Aforar a 1 lt con agua y ajustar el pH a 7.4

***Preparación de geles de poliacrilamida al 12.5%-SDS para electroforesis.**

Capa inferior

Agua destilada	10.5 ml
Acrilamida, Bis 30%/0.8%	12 ml

Tris-HCl-SDS	7.5 ml
PSA 10% (persulfato de amonio)	100 μ l
TEMED "N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine"	20 μ l

Capa superior

Agua destilada	6 ml
Acrilamida, Bis 30%/0.8%	1.5 ml
Tris-HCl-SDS	2.5 ml
PSA 10%	50 μ l
TEMED	10 μ l

*Preparación de geles para electroforesis de DNA

Agarosa (Bio-Rad) al 1% en TAE 1X

*Preparación de geles de poliacrilamida para secuencia

Solución de acrilamida 7%-urea 8M	75 ml
PSA 10%	250 μ l
TEMED	50 μ l

*SET 20%

Sacarosa 20%
EDTA 50mM
Tris-HCl pH 7.6 50mM

*Solución de acrilamida-bis 40%

Acrilamida	38 g
Bisacrilamida	2 g
Aforar a 100 ml	

*Solución de acrilamida 7%-urea 8M

Urea	192.25 g
Solución de acrilamida-bis 40%	70 ml
TBE 10X pH 8.8	40 ml
Aforar a 400 ml	

***Solución de azul de Coomassie**

Azul brillante de coomassie 0.05%

Metanol 50%

Acido acético 10%

Agua 40%

***Solución desteñidora**

Metanol 40%

Acido acético 7%

Agua 53%

***Solución de sacarosa al 20%**

Tris-HCl pH 7.5 2M

12.5 ml

NaCl

2.922 g

EDTA

0.0186 g

Sacarosa

100 g

Aforar a 500 ml con agua.

***Solución de transformación**

CaCl₂ 100mM

MgCl₂ 5mM

Tris-HCl pH 7.5 5mM

***Solución de término ("STOP mix") 10X**

Azul de bromofenol 0.25%

Xilene cianol 0.25%

Ficoll (tipo 400) en agua 25%

***TAE 1X**

Tris-acetato 40mM

EDTA 2mM

***TBE pH 8.8 10X**

Trizna base 130mM

Acido bórico 40mM

Na₂EDTA 28mM

Aforar a 1000ml

***Tris glicina SDS**

Trizna base 25mM

Glicina 192mM

SDS 0.1%

Soluciones para la cuantificación de proteínas del ensayo de β -galactosidasa.

*Solución A

CuSO₄·5H₂O 0.845 g

Se aforó 50 ml con agua

*Solución B

Tartrato de Na y K 1.69 g

Se aforó a 50 ml con agua

*Solución C

Na₂CO₃ 30.8 g

NaOH 6.16 g

Se aforó a 1000 ml con agua

*Solución D

Solución A 1 ml

Solución B 1 ml

Solución C 98 ml

*Solución E

Folin 11.83 ml

Agua 70 ml

Soluciones para la microdeterminación de la actividad β -Galactosidasa

*SA Z 5X

K₂HPO₄ 40.21g

KH₂PO₄ 13.8g

Nacl 1.9g

MgSO₄ 0.61g

*Solución A

SA Z 5X 32.67 ml

β -Mercaptoetanol 114 ml

Se aforó a 95.6 ml con agua

Tritón 10% 2.2 ml
 Lisozima 12 mg/ml 2.2 ml

***Solución B**

O-Nitrofenil β-D-Galactopiranosido (ONPG) (Sigma) 0.099 g

Se aforó a 100 ml con agua.

Oligonucleótidos usados

Nombre	Secuencia 5'a 3'	Uso
bfpT-PRS501-R	TAACAAGAGGGATCCGATGATATTG	PCR
bfpV-PRS1116-R	TTCATACATGGATCCAAAACACTCTC	PCR
bfpV-PRS1448-R	GCTCTTTTGGATCCGAAAGAATATC	PCR
bfpW-PRS1744-R	TTCATTTACAGGATCCATTTTCTTA	PCR
BFPVCAT-HD3-R	CCATCCTGAAGCTTATGACAAT	PCR
BFPWCAT-HD3-R	CTATAAAACCCTTAAGCTTCCAAG	PCR
BFPV2-T7QE-F	GAGCACTCGGGATCCAGAACGAATTCAGAGAAGAG	PCR
BFPV-1108-F	GGATGTATGAATTCATTGTCATTAC	RT-PCR
H2F2254	TCTGCTTGCAGATTATTAC	RT-PCR
BFPV-DEL3-4	GATATTCTTTCTAGATCAAAAAGAGC	PCR
UBfpT183F	GGGCGGTGCCATATTACGAG	SECUENCIA
UBfpT1995SF	TATGTCGGGCCITTTGGAG	PCR
POE-TAFCO	CCTCAATGGGATCCAATTGAATATAG	PCR/RT-PCR
CONTRA	CGGATAACAATTCACACAG	PCR
FAVOR	GGGTTTTCCAGTCACGACG	PCR/SECUENCIA

Endonucleasas de restricción y otras enzimas

*Ban*HI, *Hind*III (Boehringer Mannheim Biochemicals).

Otras enzimas: RNAsa, Transcriptasa reversa AMV, β-Galactosidasa (Boehringer Mannheim), T4 DNA ligasa (GIBCO BRL), DNAsaI (Pharmacia), *Taq* DNA polimerasa (del Instituto).

Antibióticos

Ampicilina, Estreptomicina (Sigma); Kanamicina (Boehringer Mannheim Biochemicals)

Otros materiales

- Albúmina bovina (Sigma)
- Placas de ELISA (Costar)
- Isótopo radioactivo γ -deoxi-ATP/³² Fósforo ca. 150 mCi/ml (Du Pont)
- IPTG (Isopropyl-1-thiol- β -D-galactosidasa) (GIBCO BRL)
- Estuche de purificación de fragmentos de DNA (Kit de Geneclean, Bio 101)
- Estuche de secuenciación (Kit de termosecuenciación, Amersham)
- Estuche para cuantificación de proteínas (Kit BCA Protein Assay Reagent, PIERCE)
- Estuche para exposición de películas 35 X 43 cm (Du Pont)
- Películas de rayos X (KODAK)

METODOS

Amplificación de fragmentos de DNA de plásmido por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las condiciones para la reacción son las siguientes:

Agua	-
SA de reacción 10X	-1X
Mezcla de dNTPs (1.25 mM)	-16 μ l
Oligo 1 (25 μ M)	-2 μ l
Oligo 2 (25 μ M)	-2 μ l
DNA Templado	-10ng
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerasa 5U/ μ l	<u>-0.5μl</u>
	100 μ l

<u>Temperatura(°C)</u>	<u>Tiempo (min)</u>	
I) 95	- 5	Un ciclo
II) 94	- 1	} 30 ciclos
*45-65	- 1	
70	- 1min/kb	
III) 70	- 10	Un ciclo

(*) La temperatura de alineamiento es la temperatura media de desnaturalización de los oligonucleótidos usados para la reacción. La reacción se realizó en una máquina termocicladora (Thermal cycler 480 PERKIN ELMER).

Electroforesis en geles de agarosa. Este método es utilizado para visualizar, separar y purificar DNA una vez que ha sido digerido o amplificado, para lo cual se utilizaron geles de agarosa al 1%. La electroforesis se realizó en solución amortiguadora TAE 1X a 100 volts. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5mg/ml) y el DNA se visualizó con luz ultravioleta de onda corta en un transiluminador (STRATAGENE). Las fotografías fueron tomadas con una cámara tipo Eagle Eye Stoll Video System (STRATAGENE).

Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa utilizando el estuche de GeneClean. Los fragmentos de DNA se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE 1X, las bandas correspondientes al peso molecular se cortaron y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5ml (Brinkmann Instruments INC.). Los tubos se centrifugaron (Microfuga IEC Centra-M) 15 seg a 12000 rpm para compactar la agarosa; y se les agregaron tres volúmenes de NaI y se incubaron 5 min a 55 °C. Después, se les añadieron 5µl de "glassmilk" y se reposaron en hielo 5 min. Luego de centrifugar 15 seg se tiró el sobrenadante, se resuspendieron en 700µl de solución "New Wash" y se centrifugaron 15 seg. Este último paso se repitió dos veces más; en la última centrifugación se resuspendieron en 30µl de agua tridestilada y se incubaron a 55°C por 5 min. Finalmente, se centrifugó 30 seg y se recuperó el sobrenadante en otro tubo etiquetado.

Digestión de DNA con endonucleasas de restricción. Las condiciones que se usaron para las digestiones son las recomendadas por los proveedores de las enzimas, consistiendo básicamente de la reacción siguiente:

Agua -Lo suficiente para un volumen de 50µl

SA 10X -1X

DNA -1-10µg

Enzima -Una unidad por µg de DNA
50µl

La reacción se incubó a 37°C por tres horas.

Después la enzima fue removida siguiendo el protocolo de purificación de fragmentos de DNA por GeneClean, iniciando con la adición de NaI.

Reacción de ligación. El inserto y el vector fueron digeridos con una endonucleasa de restricción que originó extremos compatibles entre ambos, luego la enzima fue removida por el método de "GeneClean" para su ligación según la siguiente reacción:

Agua	- Lo suficiente para un volumen de 10-20µl
Vector	-*
Inserto	-*
3 min a 65°C	
SA T4 Ligasa 10X	-1X
T4 Ligasa 1u/µl	$\frac{-1\mu l}{10 - 20\mu l}$

(*) La ligación de vector e inserto fue realizada en una relación molar de 1:5.

Esta reacción se incubó a 4°C toda la noche. Con el producto de la reacción de ligación se transformó a las células competentes después de que la enzima fue inactivada a 65°C por 10 min.

Transformación de *E. coli* con DNA de plásmido. La transformación se realizó por el método de tratamiento con CaCl₂ (Maniatis et al., 1982). La cepa se inoculó en 5ml de LB agregando el antibiótico correspondiente y se incubó toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm. Del cultivo anterior, se tomaron 200µl y se inocularon en 50ml de LB, se incubaron a 37°C a la misma agitación que el anterior hasta una densidad óptica (D.O_{600nm}) de 0.5. Después, el cultivo se centrifugó 10 min a 6000 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 15ml de solución de transformación fría, se mezcló y se centrifugó como se realizó anteriormente. Después de tirar el sobrenadante, se resuspendió otra vez en 15ml de solución de transformación y se incubó 30 min en hielo. Se centrifugó nuevamente, se tiró el sobrenadante, y las células competentes se resuspendieron en 1ml de solución de transformación fría (si no se utilizan en ese momento se guardan en 20% de glicerol a -70°C). Se tomaron 200µl de células competentes y se mezclaron con 0.1µg de DNA de plásmido (o con la reacción de ligación). Después de que se incubaron 60 min en hielo, se les dió un choque de calor por 5 min a 37°C y se colocaron en un tubo de vidrio que contenía 1ml de LB donde se incubaron 30 min a 37°C en agitación.

Finalmente, 100 y 200µl de la reacción de transformación anterior fueron distribuidos en cajas de LB con el antibiótico adecuado e incubadas a 37°C toda la noche.

Purificación de DNA de plásmido. La purificación de plásmidos se realizó por el método de lisis alcalina (Maniatis et al., 1982). Las bacterias que llevan los plásmidos se inocularon en 5ml de LB y se incubaron toda la noche en agitación a 37°C. La pastilla de células se obtuvo concentrando los 5ml del cultivo en tubos eppendorf por centrifugación, a 12000 rpm durante 1 min. Se resuspendió en 1ml de SA SET 20% y se centrifugó 1 min, se tiró el sobrenadante y se resuspendió en 150µl de la misma SA. Se agregaron 5µl de RNasa (10mg/ml) y se incubó 5min a temperatura ambiente; luego se añadieron 400µl de mezcla lítica, se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 10 min. Después de la incubación se agregaron 300µl de acetato de amonio 7.5M pH 7.8, se mezcló suavemente y se incubó en hielo 30 min. Los tubos se centrifugaron 10 min a 12000 rpm y el sobrenadante se pasó a un tubo eppendorf limpio. El DNA se precipitó con 500µl de isopropanol y se incubó 10 min a temperatura ambiente; luego se centrifugó 10 min a 12000 rpm, se tiró el sobrenadante y se le agregaron 800µl de etanol al 70%, se centrifugó nuevamente y se repitió el lavado con etanol al 70%. Después de la última centrifugación se tiró el sobrenadante y se metieron a secar con vacío (Savant SpeedVac SC100). El DNA se resuspendió en 50µl de agua tridestilada.

Minicélulas. Para la expresión de proteínas en minicélulas, se usaron los cultivos de las cepas de P678-54 transformada con los plásmidos: pBTA-BHI-TVW, pBTA-BHI-VW, pBTA-BHI-TW, pBTA-BHI-TV, pBTA-BHI-T y pWKS-130. Se puso un inóculo de los cultivos en 5ml de LB, adicionando 40mg/ml del antibiótico kanamicina; luego se incubó toda la noche en agitación a 37°C. Se tomó de ese cultivo para inocular 1:1000 un matraz con 250ml de M9, el cual se incubó a 37°C en agitación por más de 18 horas. El gradiente de sacarosa se preparó de la siguiente manera: se llenaron tubos corex de 30ml con 25ml de sacarosa al 20%, se taparon con papel aluminio y se guardaron en el congelador toda la noche. Los cultivos se centrifugaron en botellas de 250ml, 20 min a 2000rpm a 4°C. El sobrenadante se pasó a botellas de 250ml limpias. Nuevamente se centrifugó 20 min a 5000rpm a 4°C y se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 1.5ml de BSA frío (puede hacerse en el vortex). Se colocaron las células lentamente sobre el gradiente de sacarosa, con una pipeta Pasteur por la pared del tubo (los tubos corex con sacarosa se descongelaron una hora antes a temperatura ambiente para permitir la formación del gradiente). Se centrifugaron 15 min a 5000rpm a 4°C y con una pipeta Pasteur se tomó la banda correspondiente a las minicélulas

(se debe ver arriba) y se colocaron en un tubo de transformación de 50ml (en este paso se observa una pastilla en el fondo del tubo corex que contiene el gradiente, ésta corresponde a las células normales). Luego se les agregó 20ml de BSG frío y se centrifugaron durante 10 min a 10000rpm a 4°C. La pastilla se resuspendió en 1.5ml de BSG con ayuda del vortex.

Las minicélulas se colocaron tres veces en el gradiente hasta que la banda que las contenía se vio pura. Se resuspendió la pastilla de minicélulas en 2ml de medio MAM (DIFCO) y se colocó en tubos estériles de vidrio donde se les agregó 1mM de IPTG luego se incubaron 30 min en agitación a 37°C. Se les agregó 10µCi de Metionina ³⁵S y se incubaron en las mismas condiciones que el paso anterior. Por último, se centrifugó el cultivo en un tubo eppendorf de 1.5ml 2 min a 12000rpm a temperatura ambiente. Las muestras se resuspendieron en 100µl de PBS 1X, 5µl de cada muestra más 10µl de mezcla de corrida para electroforesis de proteínas, se hirvieron por 10min previamente a ser analizadas en gel de poliacrilamida.

Expresión de proteínas bajo el promotor T7. Se usaron los cultivos de las cepas de BL21(DE3) transformada con los plásmidos: pBTA-T7-3D, pBTA-T7-VW, pBTA-T7-TW, pBTA-T7-TV y pBTA-T7-T y el pWKS-130. Se puso un inóculo de cada cultivo en 5ml de LB adicionando 40µg/ml del antibiótico kanamicina, luego se incubó toda la noche en agitación a 37°C. Al siguiente día, 50ml de LB más el antibiótico se inocularon con una dilución 1:40 de cada cepa y se incubaron en agitación a 37°C hasta una D.O_{600nm} de 0.7. Posteriormente, se les agregó IPTG a una concentración final de 1mM y se continuó la incubación por tres horas. Después de este tiempo, se tomaron 5ml de cada cultivo y se centrifugaron en tubos de transformación por 10min a 4500 rpm a 4°C. La pastilla se lavó con 5ml de medio MAM y se centrifugó en las mismas condiciones que en el paso anterior; después la pastilla se resuspendió en 5ml de este mismo medio y se colocó en tubos de vidrio estériles, donde se les agregó rifampicina a una concentración de 200µg/ml, luego se incubó 30 min en agitación a 37°C. Finalmente, se les adicionó 10µCi de metionina marcada con ³⁵S y se incubó 30 min en agitación a 37°C. Cada muestra se centrifugó 5 min a 10000rpm a 4°C y la pastilla se resuspendió en 50µl de PBS 1X, de los cuales se tomaron 5µl que se hirvieron 10 min, y después se les agregó 10µl de mezcla de corrida para electroforesis de proteínas, y se analizaron en gel de poliacrilamida.

Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS: Las preparaciones de proteínas fueron analizadas por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 12.5%-SDS, utilizando una solución amortiguadora de Tris glicina-SDS y una corriente de 20mA (200 volts). La tinción de los geles se realizó con una solución de azul de Coomassie; para esto se calentó 2 min a 80°C y se destiñó calentándolo a la misma temperatura con una solución de metanol al 70% y ácido acético al 7%. El gel se secó una hora con vacío en un secador de geles (GEL DRYER BIO-RAD) y se colocó en un estuche con un intensificador y una película de rayos X. Los resultados se analizaron en el autorradiograma.

Secuenciación de DNA de plásmido. La secuencia nucleotídica se determinó mediante el método de Sanger (Sanger et al., 1977). Para esto se utilizó el estuche de Termostequecuenasa como lo recomiendan los proveedores. El protocolo consta básicamente de las siguientes reacciones:

1) Marcaje de oligo con fósforo radioactivo (cinación)

Agua	-Lo necesario para un volumen final de 10µl
Oligo 25µM	-1µl
SA Kinasa 10X	-1X
Enzima Cinasa 10U/µl	-1µl
γ ³² P ATP	-20µCi/reacción

Se incubó la reacción 30 min a 37°C y se inactivó la enzima incubando 5 min a 55°C.

2) Mezcla de reacción

Agua	-
DNA molde	-100ng
SA de reacción 10X	-1X
Termostequecuenasa 4U/ml	-0.5µl
Oligo marcado	<u>-2µl</u>
	17.5µl

Se prepararon cuatro tubos de 0.5ml, cada uno con 3µl de uno de los cuatro dideoxinucleótidos (terminadores ddGTP, ddATP, ddTTP y ddCTP). A cada tubo se le agregó 5µl de la mezcla de reacción y una gota de aceite mineral. La reacción de secuencia se llevó a cabo mediante un PCR que consistió de las siguientes condiciones:

<u>Temperatura(°C)</u>	<u>Tiempo</u>	
I) 95	- 3min	Un ciclo
II) 95	- 30seg	} 70 ciclos
50	- 30seg	
70	- 1min	

Al final del PCR, se adicionaron 4µl de la solución de término ("STOP mix") y los productos se desnaturalizaron a 95°C durante 5min. Las reacciones se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida 7%-urea 8M en solución de TBE 1X, a 40 watts. El tiempo de electroforesis varió según el número de nucleótidos que se querían analizar. El gel de poliacrilamida se secó una hora con vacío en un secador de geles (GEL DRYER BIO-RAD) y se colocó en un estuche con un intensificador y una película de rayos X. Se realizó la lectura de la secuencia observada en el autorradiograma.

Ensayo de actividad de CAT

1.-Las cepas de EPEC que llevan las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, se inocularon en 50ml de LB adicionando 100µg/ml del antibiótico ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche con una agitación de 110 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron una $D.O_{600nm}$ de 1.0, se tomaron 10ml de cada cultivo y se centrifugaron 10 min a 6000rpm a 4°C. La pastilla de bacterias se lavó con 10ml de PBS 1X frío y nuevamente se centrifugaron. La pastilla se resuspendió en PBS 1X frío ajustando a una $D.O_{600nm}$ de 1.0. Con estos cultivos se inocularon 1:50 matraces con 50ml de DME, adicionando el antibiótico anterior y 500µl de LB, los matraces se incubaron a 37°C con una agitación de 200rpm. Se tomaron muestras de 1.5ml de cada cultivo cuando alcanzaron una $D.O_{600nm}$ de 1.0 y 1.4.

2.-Preparación de extracto. Las muestras se centrifugaron 1 min a 12000 rpm a 4°C, se tiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1ml de SA de lavado fría, se centrifugó en las mismas condiciones, y se resuspendió en 500µl de la SA de lavado con Tritón al 0.1%. Las muestras se incubaron 20 min a 37°C en agitación, en una gradilla que se colocó ligeramente inclinada. Se centrifugaron 10 min a 12000 rpm a 4°C y el sobrenadante se recuperó en un tubo limpio. Se guardaron a -20°C.

RESULTADOS

El locus *bfpTVW* forma un operón

El fenotipo de adherencia localizada de EPEC es mediado por los pili BFP, cuya subunidad estructural es la proteína BfpA. La expresión del gen *bfpA* es dependiente del activador transcripcional BfpT que, además, autorregula la expresión de su gen *bfpT*, el cual forma parte del locus *bfpTVW* (*per*). En estudios recientes, se implicó a *bfpW* (el tercer gen del locus *bfpTVW*), como el principal activador de la expresión de los genes *eae* y *esp*; sin embargo, publicaciones posteriores han involucrado a *bfpT* (*perA*) en la regulación de los genes *eae*, *esp* y *tir*. Actualmente, los mecanismos moleculares por los que se lleva a cabo esta regulación no son claros. Dada la importancia del locus *bfpTVW* en la regulación de genes de virulencia, uno de nuestros objetivos fue saber si los genes de este locus forman un operón. Para este propósito, seguimos las siguientes estrategias:

A) Para evaluar si existen promotores para *bfpV* y *bfpW*, o si forman una unidad transcripcional común con *bfpT*, se construyeron fusiones transcripcionales de segmentos que contienen las regiones intergénicas del locus *bfpTVW* al gen reportero *cat*. Los segmentos del locus se obtuvieron por PCR a partir del plásmido EAF y se clonaron en el vector pKK232-8, que contiene el gen *cat* sin promotor. Los plásmidos obtenidos fueron pbfpV-cat, pbfpVW-cat y pbfpW-cat (Fig. 5). Por otra parte, fusiones a los genes *bfpV* y *bfpW* que contienen la región reguladora de *bfpT* se obtuvieron a partir del plásmido pBTA-BHI-VW, que contiene el locus *bfpTVW* al cual se le removió en fase el gen *bfpT*. Lo anterior, debido a que la presencia de *bfpT* en un plásmido multicopia favorece la aparición de mutaciones en la región reguladora o estructural de *bfpT*, las cuales anulan su expresión (datos no mostrados). De esta manera, se construyeron los plásmidos pbfp Δ T V-cat y pbfp Δ T VW-cat (Fig. 5). Para el ensayo se incluyó el plásmido pUSTI66, que contiene la región reguladora de *bfpT* y sus primeros 14 codones (Fig. 5) y que fue construido previamente en el laboratorio (Martínez-Laguna et al., en prensa 1999). La actividad de CAT producida por estas fusiones se determinó en la cepa de EPEC B171-8 crecida en medio DME a 37°C, condiciones óptimas para la expresión de *bfpT*. La actividad de CAT se determinó a partir de muestras obtenidas de cultivos de cada cepa creciendo por duplicado, cuando alcanzaron una D.O._{600nm} de 1.0.

Los plásmidos pUSTI66 y pbfp Δ T V-cat que contienen fusiones a la región reguladora de *bfpT*, produjeron actividad de CAT, a diferencia del plásmido pbfpV-cat, que contiene únicamente la región intergénica entre *bfpT* y *bfpV*, la cual no fue activa (Fig. 5). Esto nos sugiere que para que se

¿ Forman *bfpT*, *bfpV* y *bfpW* un operón ?



Fusiones transcripcionales a *cat*

Plásmidos	Actividad específica de CAT ($\mu\text{mole}/\text{min}.\text{mg}$)
JST166	3576 \pm 204
<i>bfp</i> Δ TV- <i>cat</i>	8017 \pm 290
<i>bfpV</i> - <i>cat</i>	10
<i>obfp</i> Δ TVW- <i>cat</i>	814 \pm 177
<i>obfpVW</i> - <i>cat</i>	10
<i>obfpW</i> - <i>cat</i>	4
<i>obfp</i> Δ T Δ VW - <i>cat</i>	7810 \pm 535

Figura 5. Fusiones transcripcionales de los genes del locus *bfpTVW* al gen reportero *cat*. Su expresión fue medida en la cepa de EPEC B171-8 crecida en medio DME a 37°C. La actividad específica de CAT fue obtenida a una D.O_{600nm} de 1.0. Los valores representan el promedio y la desviación estándar obtenidos de dos experimentos diferentes.

expresión de *bfpV* se necesita de la región promotora de *bfpT*. Por otro lado, el plásmido *pbfpΔT VW-cat*, que también incluye la región reguladora de *bfpT*, igualmente produjo actividad de CAT; sin embargo, el plásmido *pbfpVW-cat* que contiene la región intergénica entre *bfpT* y *bfpV*, el gen *bfpV* y la región intergénica entre *bfpV* y *bfpW*, ya no fue activo, del mismo modo que el plásmido *pbfpW-cat* que sólo contiene la región intergénica entre *bfpV* y *bfpW* (Fig. 5), indicándonos que también *bfpW* para expresarse necesita de la región reguladora de *bfpT*. Lo anterior nos indica que los genes de este locus se encuentran formando un operón, que se expresa a partir del promotor previamente caracterizado para *bfpT* (Martínez-Laguna et al., en prensa 1999). Interesantemente, el plásmido *pbfpΔT V-cat* produjo nueve veces más actividad de CAT que el plásmido *pbfpΔT VW-cat*. A este respecto, decidimos investigar si esta diferencia de actividad se debía a la influencia negativa de *bfpV* (que en esta última fusión está completo) sobre la expresión de *bfpW*, como se observó para *bfpT* y *bfpA* en experimentos previos (Sánchez-SanMartín, datos no publicados). Por lo tanto, se construyó un plásmido con una fusión de *bfpW-cat*, llamado *pbfpΔTΔV W-cat*, el cual contiene la región reguladora de *bfpT*, una sustracción en fase de *bfpT* y *bfpV* y los primeros 14 codones de *bfpW*, a partir de un fragmento obtenido del plásmido pBTA-BHI-W (Tabla I). Este plásmido expresó los mismos niveles de actividad de CAT que el plásmido *pbfpΔT V-cat*, lo cual nos sugiere que para el caso del plásmido *pbfpΔTVW-cat*, *bfpV* está influyendo negativamente en la expresión de *bfpW*; sin embargo, a la fecha no conocemos el mecanismo por el cual ejerce este efecto.

B) Otra estrategia que abordamos para definir si los genes del locus *bfpTVW* se transcriben formando parte de un RNA mensajero policistrónico, fue desarrollar experimentos de RT-PCR. Para esto, a partir de RNA total de EPEC B171-8 crecida en DME a 37°C, se sintetizó cDNA por transcripción reversa con un oligonucleótido complementario a la cadena codificante del gen *bfpW*. El cDNA se usó como templado para preparar diferentes reacciones de PCR con oligonucleótidos que permiten amplificar fragmentos que incluyen a *bfpT* y *bfpV*, a *bfpV* y *bfpW* y el locus completo, respectivamente (Fig. 6). Como control negativo del ensayo, se hicieron las mismas reacciones de PCR utilizando como molde RNA de una reacción sin transcriptasa reversa como se observa en la Figura 6: de las tres reacciones donde se usó como templado el cDNA se obtuvieron productos de PCR (carriles con el signo +). Por el contrario, de las reacciones provenientes del control negativo, no vimos señal de amplificación, lo que nos aseguraba que el RNA no estaba contaminado con DNA (Fig. 6, carriles con el signo -). Al realizar los mismos PCR's utilizando como template DNA del plásmido EAF, se verificó que los fragmentos obtenidos correspondían a los genes del locus (Fig. 6, carriles señalados con G). Con este ensayo se corroboró que los genes del locus *bfpTVW* forman un

RT-PCR de *bfpTVW*

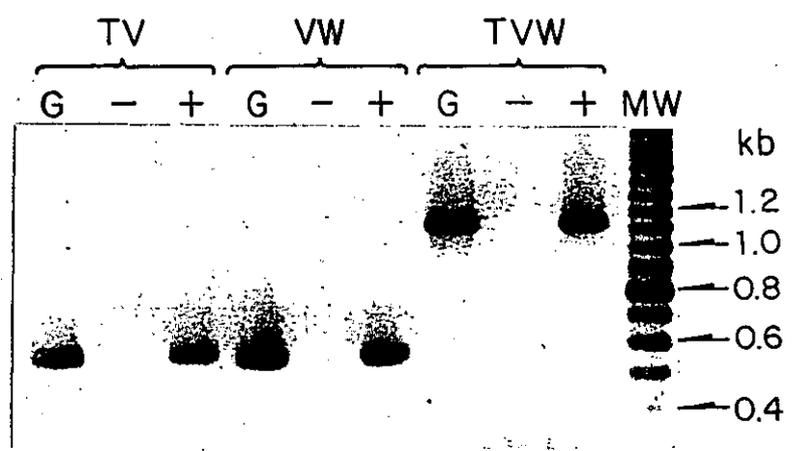
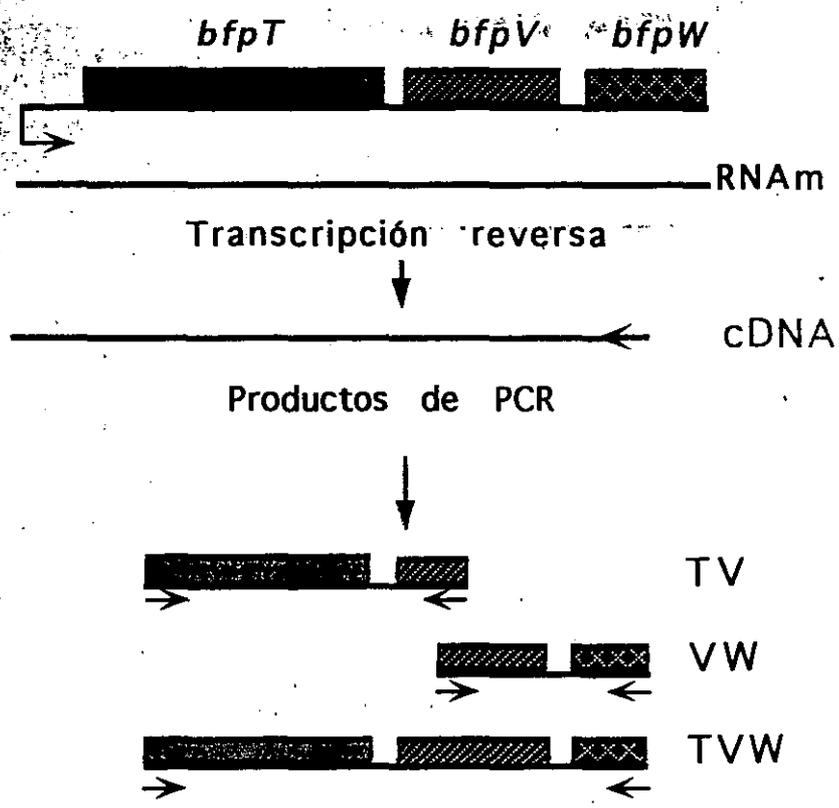


Figura 6. RT-PCR de RNA aislado de la cepa de EPEC silvestre. Los productos de RT-PCR son mostrados en los carriles señalados con el signo (+). No se detectaron productos de RT-PCR en los controles negativos del ensayo, obtenidos a partir de una reacción sin transcriptasa reversa, cuyos carriles son señalados con el signo (-). El tamaño de los productos de RT-PCR se verificó al realizar las mismas reacciones de PCR utilizando como molde el plásmido EAF, cuyos carriles son señalados con (G). **TV**, se amplificó con oligos complementarios a *bfpT* y *bfpV*; **VW**, se amplificó con oligos complementarios a *bfpV* y *bfpW*; **TVW**, se amplificó con oligos complementarios a *bfpT* y *bfpW*. El marcador de peso molecular es señalado como **MW**.

operón, ya que se transcriben como parte del mismo RNA mensajero.

C) Adicionalmente, en experimentos de "primer extension" no se observó ninguna señal que indicara la presencia de un inicio de transcripción alrededor de las regiones intergénicas del locus *bfpTVW*. Mientras que en las mismas condiciones experimentales, corroboramos el inicio de transcripción previamente identificado para el promotor localizado corriente arriba del gen *bfpT* (datos no mostrados; Martínez-Laguna et al., en prensa 1999).

En su conjunto, estos resultados muestran que los genes *bfpT*, *bfpV* y *bfpW* están organizados como un operón y que su transcripción depende del promotor de *bfpT*.

Expresión de *bfpT*, *bfpV* y *bfpW*.

Una vez definida la organización transcripcional del locus, nos enfocamos en determinar si los tres genes que lo componen codifican para una proteína. Los sistemas probados para tal propósito fueron los siguientes:

A) Minicélulas

Con esta técnica podemos analizar de manera específica la expresión de proteínas codificadas por los genes clonados en plásmidos recombinantes, y cuyos productos se marcan radioactivamente, se separan electroforéticamente en un gel de poliacrilamida y se detectan por autorradiografía. Así, los plásmidos pBTA-BHI-TVW (*bfpT*, *bfpV* y *bfpW*), pBTA-BHI-VW (*bfpV* y *bfpW*), pBTA-BHI-TW (*bfpT* y *bfpW*), pBTA-BHI-TV (*bfpT* y *bfpV*), pBTA-BHI-T (*bfpT*) y el vector pWKS-130 (Tabla I; Fig. 7), se transformaron en la cepa productora de minicélulas *E. coli* p678-54.

Como se muestra en la Figura 8, el vector mostró la presencia de una banda prominente de 30 kDa, que corresponde al producto del gen que codifica para la resistencia a kanamicina (Fig. 8, carril 1). Para el caso del plásmido que lleva los tres genes del operón, se observó además la presencia de una banda predominante con un peso molecular aparente que coincide con el esperado para BfpW de 10.5 kDa (Fig. 8, carril 2). Consistentemente, esta banda se observó también en aquellos plásmidos que llevaban *bfpW*, como los que sólo llevan *bfpV* y *bfpW*, o *bfpT* y *bfpW* (Fig. 8, carriles 3 y 4), y no así para aquellos que no contienen *bfpW* (Fig. 8, carriles 5 y 6). Mientras que estos datos indican que la banda de 10.5 kDa es el producto de *bfpW*, ninguna banda se relacionó con la presencia de BfpT y BfpV, las cuales migrarían alrededor de los 31.7 kDa y 14.5 kDa, respectivamente.

B) Experimento de expresión con T7

Otra estrategia que seguimos con el fin de poder observar el producto de los genes del operón *bfpTVW*, fue un experimento de expresión con los genes bajo el control del promotor T7. En este caso, los diferentes fragmentos del operón *bfpTVW*, contenidos en los plásmidos que usamos en el

Plásmidos que contienen una remoción en fase de *bfpT*, *bfpV* o *bfpW*.

Plásmidos

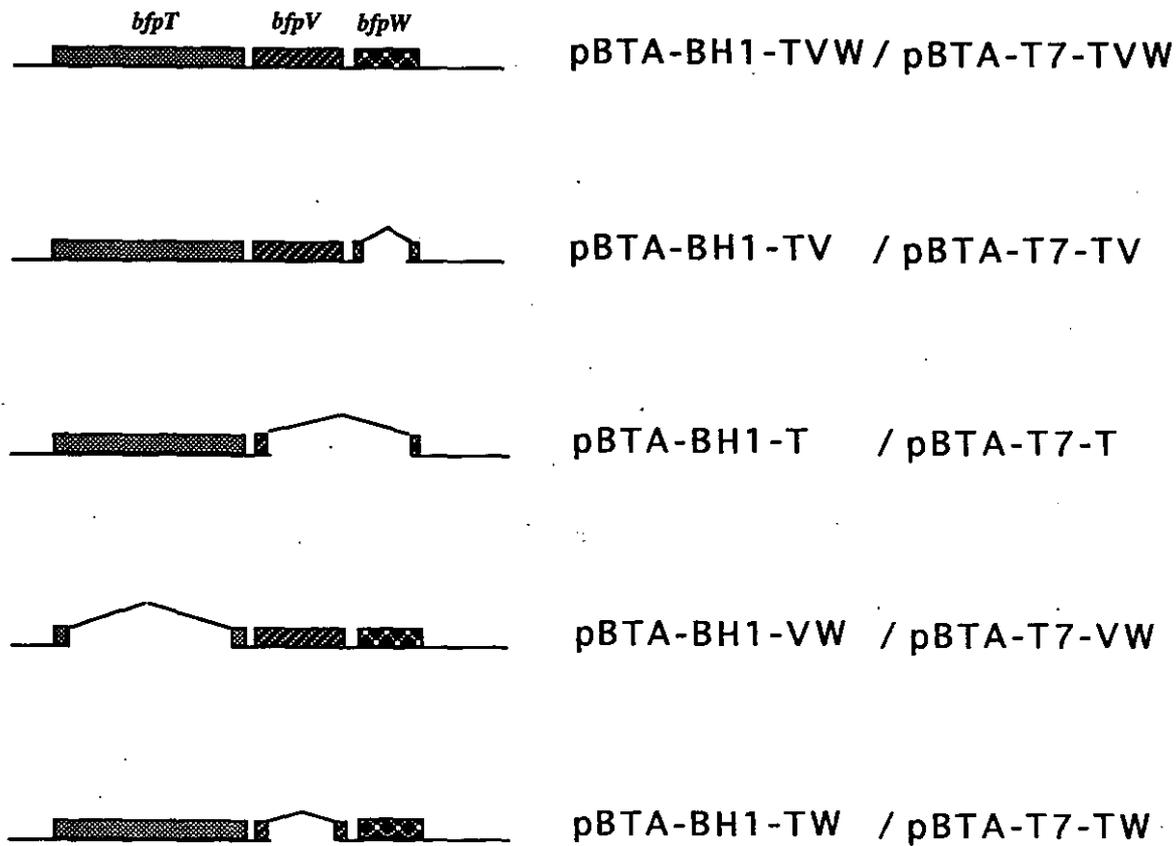


Figura 7 Plásmidos usados en los experimentos de expresión de proteínas. Los plásmidos usados en el experimento de minicélulas se obtuvieron al clonar los fragmentos mostrados arriba, en el vector pWKS-130, a favor del promotor *tac* y son nombrados como pBTA-BHI. Los plásmidos usados en el experimento de expresión con el promotor T7 se obtuvieron al clonar dichos fragmentos en el mismo vector a favor del promotor T7 y son nombrados como pBTA-T7.

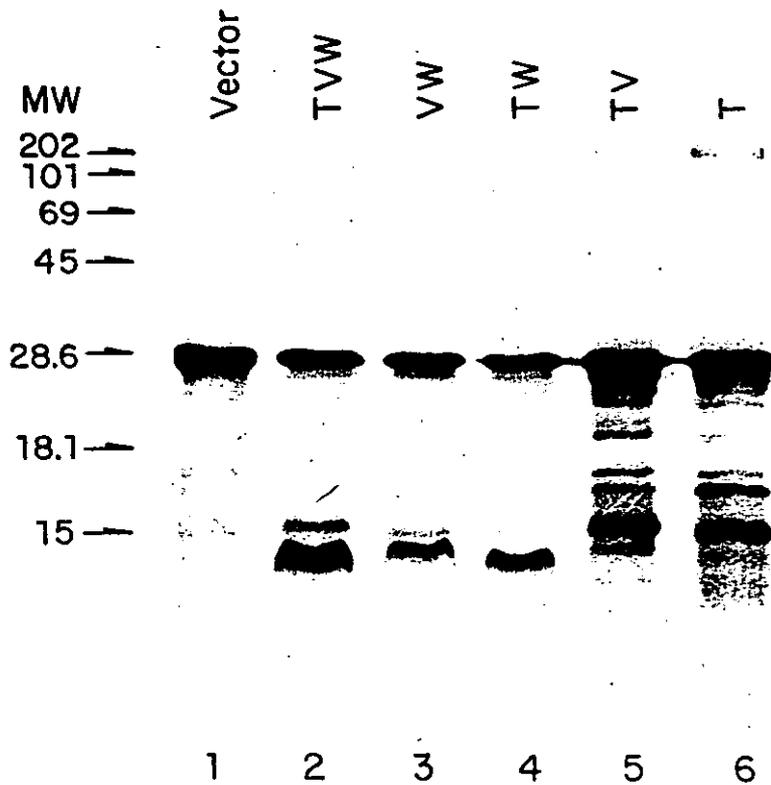


Figura 8 Expresión del locus *bfpTVW* mediante minicélulas. Autorradiograma de proteínas marcadas radioactivamente expresadas en la cepa *E. coli* p678-54, transformada con los plásmidos: 1, pWKS-130 (vector); 2, pBTA-BHI-3D (contiene *bfpT*, *bfpV* y *bfpW*); 3, pBTA-BHI-VW (contiene *bfpV* y *bfpW*); 4, pHTA-BHI-TW (contiene *bfpT* y *bfpW*); 5, pBTA-BHI-TV (contiene *bfpT* y *bfpV*); 6, pBTA-BHI-T (contiene *bfpT*).

experimento de expresión con minicélulas, se clonaron en el plásmido pWKS-130 a favor del promotor T7, y se transformaron en la cepa *E. coli* BL21(DE-3) (Fig. 7). En este sistema, únicamente los genes que están bajo el control de dicho promotor son expresados por la polimerasa T7, codificada en el cromosoma de la cepa BL21(DE-3) y cuya expresión se induce con IPTG. Por su parte, la adición de rifampicina bloquea la expresión de genes dependientes de la RNA polimerasa de *E. coli*, permitiendo analizar de manera específica la expresión de proteínas controladas por el promotor T7. De esta manera, las proteínas expresadas a partir de los diferentes plásmidos se marcaron radioactivamente, se corrieron en un gel de poliacrilamida y se analizaron en un autorradiograma (Fig. 9). Nuevamente observamos la presencia de una banda que corresponde al peso de BfpW, para plásmidos que contienen todo el operón, solo *bfpV* y *bfpW*, o *bfpT* y *bfpW* (Fig. 9, carriles 2, 3 y 4); asimismo, esta banda no se observa en plásmidos que no contienen *bfpW* (Fig. 9, carriles 5 y 6). Con este sistema de expresión tampoco se obtuvieron bandas específicas que pudieran corresponder a los productos de *bfpT* y *bfpV*.

C) Expresión traduccional de *bfpT* y *bfpV*

Con las estrategias anteriormente descritas no fue posible observar los productos de los genes *bfpT* y *bfpV*. Con el propósito de determinar si ambos genes codifican para una proteína que es traducida a partir del transcrito de este operón, se generaron diferentes fusiones traduccionales al gen *lacZ* (Fig. 10). Dichas fusiones contienen fragmentos, obtenidos por PCR, que llevan la región reguladora de *bfpT* y parte de la región estructural de *bfpT*, *bfpV* o *bfpW* fusionadas en fase al gen reportero *lacZ*, contenido en el plásmido pRS414. De esta manera, las fusiones traduccionales reflejan no sólo la actividad transcripcional de la región 5' reguladora, sino también el nivel de traducción del gen en estudio.

Los plásmidos generados fueron los siguientes: pbfpT-1, cuyo fragmento se obtuvo del plásmido EAF e incluye la región reguladora y 99 codones de *bfpT*; pbfp Δ T V-1, cuyo fragmento se obtuvo del plásmido pBTA-BHI-VW y contiene la región reguladora de *bfpT*, la remoción en fase de *bfpT* y 125 codones de *bfpV*; pbfp Δ T Δ V W-1, cuyo fragmento se obtuvo del plásmido pBTA-BHI-W y que contiene la región reguladora de *bfpT*, la remoción en fase de *bfpT* y *bfpV* y 76 codones de *bfpW*. Como control positivo de nuestro ensayo incluimos una fusión traduccional a *lacZ* del gen *ompSI* (que codifica para una proteína de membrana externa de *Salmonella typhi*), construida previamente en el laboratorio (Oropeza et al., 1999). La expresión de estas fusiones se determinó en la cepa *E. coli* MC4100 complementada con el plásmido pCS-T, que lleva *bfpT*. La medición a partir de

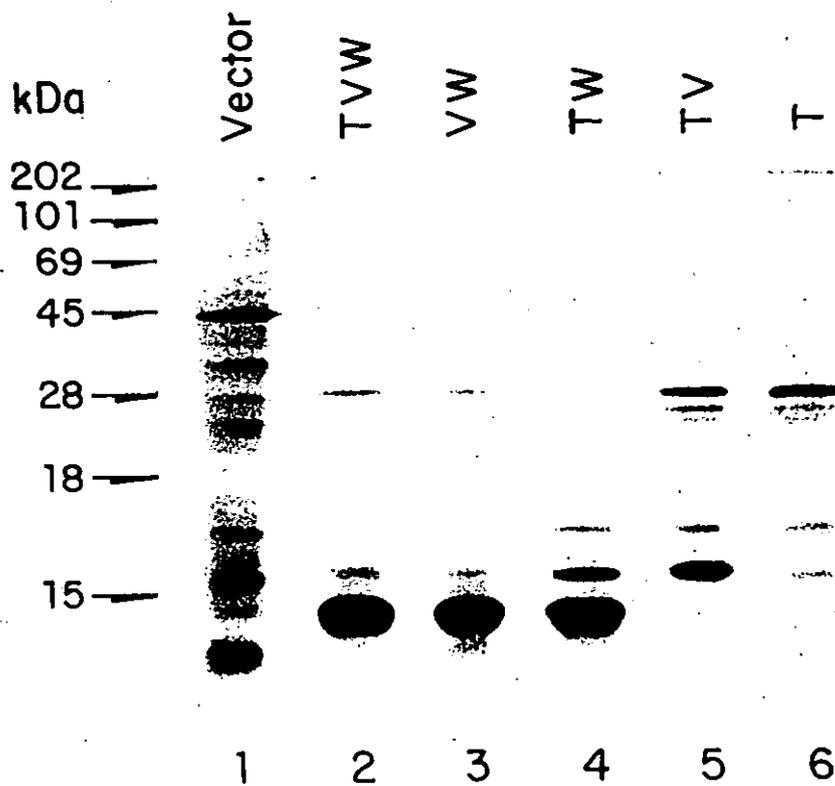
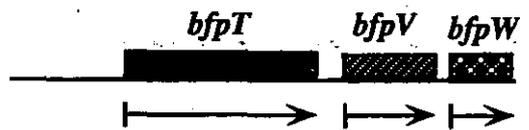


Figura 9 Expresión del locus *bfpTVW* con el promotor T7. Autorradiograma de proteínas marcadas-radioactivamente expresadas en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)^{lacZ}, transformada con los plásmidos: 1, pWKS-130 (vector); 2, pBTA-T7-3D (contiene *bfpT*, *bfpV* y *bfpW*); 3, pBTA-T7-VW (contiene a *bfpV* y *bfpW*); 4, pBTA-T7-TW (contiene *bfpT* y *bfpW*); 5, pBTA-T7-TV(contiene *bfpT* y *bfpV*); 6, pBTA-T7-T (contiene *bfpT*).

Expresión traduccional de *bfpT*, *bfpV* y *bfpW*.

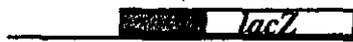


Fusiones traduccionales a *lacZ*

Plásmidos

Actividad específica de *B*-gal

pbfpT-1



2053 ± 251

pbfΔT-V1



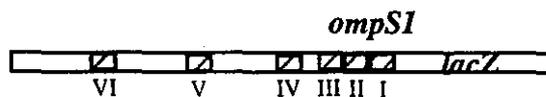
3153 ± 257

pbfpΔTΔV-W1



2794 ± 49

pRO266



1142 ± 203

pRS414



< 5

Figura 10. Fusiones traduccionales de los genes del locus *bfpTVW* al gen reportero *lacZ*. La actividad de las fusiones se determinó en la cepa MC4100/pK3-ΔVW crecida en medio LB a 37°C. Se muestra la actividad específica de β-galactosidasa-obtenida a una D.O_{600nm} de 1.0. Los valores que se muestran son el promedio y la desviación estándar obtenidos de dos experimentos diferentes.

muestras de cultivos crecidas por duplicado en medio LB a 37°C, cuando alcanzaron una D.O_{600nm} de 1.0.

Las fusiones de *bfpT* y *bfpV* fueron activas y se expresaron a niveles similares que la fusión de *bfpW* (Fig. 10), lo que indicó que estos genes codifican para proteínas que son traducidas. Por otro lado, la fusión de *ompS1* se expresó dos veces menos que las fusiones anteriores; sin embargo, a diferencia de *bfpT* y *bfpV*, aún con estos niveles de expresión la proteína OmpS1 sí puede ser vista en un gel teñido con Coomassie (Oropeza et al., 1999). Estos resultados nos sugieren que *bfpT* y *bfpV* son genes que se traducen, y que los niveles celulares de sus productos se regulan fuertemente por mecanismos de control post-traduccionales como, por ejemplo, los que regulan la estabilidad de la proteína.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Durante la primera etapa de colonización, EPEC produce el fenotipo de adherencia localizada, el cual está mediado por los pili BFP. La subunidad estructural de estos filamentos es la proteína BfpA, cuyo gen *bfpA* está codificado en el plásmido EAF. La expresión de *bfpA* es dependiente del activador transcripcional BfpT cuyo gen, *bfpT*, pertenece al locus *bfpTVW* (*per*), localizado también en el plásmido EAF. Este locus contiene además del gen *bfpT*, los genes *bfpV* y *bfpW*, orientados en la misma dirección que *bfpT* y separados por espacios de aproximadamente 40 nucleótidos. Publicaciones recientes han sugerido que el locus *bfpTVW* (a través de *bfpW*) también está involucrado en la expresión de genes de EPEC que se requieren durante la generación de la lesión A/E (Gómez-Duarte y Kaper, 1995), tal es el caso de los genes *sep/esc*, *eae*, *tir* y *esp*, los cuales están codificados en la región del cromosoma de la bacteria llamada LEE. Sin embargo, el estudio detallado de los mecanismos que regulan la expresión de estos genes está aún en proceso.

El análisis de la secuencia del locus *bfpTVW*, sugiere que los tres genes que lo componen constituyen un operón. Por ejemplo, la separación entre *bfpT* y *bfpV*, y entre *bfpV* y *bfpW*, es menor de 50 pb; además, no existen secuencias con el potencial de formar terminadores de la transcripción. Sin embargo, esta predicción no había sido probada experimentalmente.

A través del uso de fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, determinamos que las regiones intergénicas entre *bfpT-bfpV* y *bfpV-bfpW* no presentan actividad transcripcional, indicando la ausencia de secuencias promotoras (Fig. 5). Más aún, experimentos de extensión del iniciador ("primer extension"), apoyaron estas observaciones, ya que ni para *bfpV* ni para *bfpW*, pudimos observar un posible inicio de transcripción (datos no mostrados).

Lo anterior contrasta con la actividad transcripcional de una fusión a la región reguladora de *bfpT*, en la cual previamente identificamos la presencia de un promotor (Fig. 3; Martínez-Laguna et al., en prensa 1999). En su conjunto, estos datos indicaron que la transcripción de los genes del locus depende del promotor localizado corriente arriba de *bfpT* y que éstos se expresan como parte de un mensajero policistrónico. Lo anterior fue corroborado mediante experimentos de RT-PCR, los cuales permitieron la síntesis de un cDNA que se extiende hasta *bfpW* (Fig. 6). A su vez, estos datos también señalan que la expresión de *bfpV* y *bfpW* está regulada por el producto de *bfpT*, dado que éste se autorregula (Martínez-Laguna et al., en prensa 1999). Dado que el producto de *bfpW* parece estar involucrado en la regulación de genes contenidos en la región LEE, lo anterior también indicaría que éstos están bajo el control indirecto de BfpT, el cual junto con BfpW

formaría parte de una cascada reguladora en EPEC. Sin embargo, aún no existe evidencia clara de la función del posible producto de *bfpW* (ver más abajo).

Por otro lado, el bajo nivel de actividad que produjo el plásmido *pbfpΔT VW-cat*, el cual contiene la región reguladora de *bfpT*, *bfpV* y los primeros 14 codones de *bfpW*, en comparación con la actividad mostrada por los plásmidos *pbfpΔT V-cat* y *pbfpΔTΔV W-cat*, sugirió que la presencia de *bfpV* ejerce un efecto negativo sobre la expresión del operón.

Otros datos del grupo apoyan la noción de que *bfpV* modula negativamente la expresión de *bfpA* o *bfpT*, ya que la complementación de su expresión con *bfpT* o con una construcción de *bfpTVW* en donde se ha realizado una sustracción en fase de *bfpV*, permite niveles de expresión de 5 a 10 veces mayores que en presencia de *bfpV* (Bustamante, et al., 1998; Sánchez-SanMartín, et al., datos no publicados). A la fecha, no es claro si *bfpV* actúa en *cis* influenciando la estabilidad del transcrito de *bfpT* reduciendo así los niveles de la proteína, o si su producto interactúa con BfpT modulando su actividad o compitiendo por las regiones promotoras de *bfpA* y *bfpT*. Actualmente, se están realizando los experimentos enfocados a definir la función de *bfpV*.

Se han reportado otros sistemas que presentan homología al operón *bfpTVW* a nivel de organización, más no a nivel de secuencia, como son el operón *marRAB*, que confiere resistencia a antibióticos y superóxidos en *E. coli*, donde el producto de *marA*, el cual es miembro de la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS, activa la transcripción del operón, mientras que el producto de *marR* lo regula negativamente actuando sobre su región promotora. Otro sistema similar a *bfpTVW* es el operón *bglCSB*, involucrado en vías metabólicas en *E. coli*, en el que *bglS* ejerce su efecto negativo al interferir directamente con el eficiente funcionamiento del producto de *bglC*, que es el regulador positivo de la expresión del operón (Martin et al., 1996; Mahadevan and Wright, 1987).

Las evidencias señaladas anteriormente sugieren que los genes *bfpV* y *bfpW* codifican para proteínas que juegan un papel diferente en la regulación de diferentes genes en EPEC. Con el propósito de iniciar la caracterización de sus posibles productos y dado que la secuencia de aminoácidos deducida a partir de los genes no muestra clara homología con proteínas reportadas a la fecha, nos enfocamos en definir si estos genes se traducen en proteína una vez que han sido transcritos.

Así, mediante experimentos en los que analizamos la síntesis *de novo* de proteínas codificadas por el operón, determinamos que *bfpW* codifica para una proteína que

corresponde al peso molecular esperado para BfpW (Figs. 8 y 9). Sin embargo, esta metodología no permitió observar el producto de *bfpT* ni de *bfpV*.

Sin embargo, para BfpT hemos caracterizado una función bien definida y su homología con una familia de activadores transcripcionales son elementos que permiten suponer que la célula mantiene cantidades de proteína que están por debajo de los niveles de detección de los ensayos empleados. Sin embargo, para el posible producto de *bfpV* no contábamos con tales evidencias.

Con el propósito de determinar si los genes del operón se traducen, realizamos experimentos de minicélulas y de expresión con el promotor T7, en los que sólo fue posible observar el producto del gen *bfpW*.

Debido a que no se detectó el producto de *bfpT* ni de *bfpV* por los sistemas anteriores, abordamos otra estrategia para determinar su expresión, mediante la construcción de fusiones traduccionales de *bfpT* y *bfpV* al gen reportero *lacZ*, las cuales incluían la región reguladora de *bfpT* y los primeros 99 y 125 codones de estos genes, respectivamente. El análisis de estas construcciones mostró que *bfpT* y *bfpV* son genes que se traducen, expresando niveles de actividad similares a un plásmido con una fusión de *bfpW-lacZ*, el cual contiene la región reguladora de *bfpT* y los primeros 79 codones de *bfpW* (Fig. 10). En este ensayo, se incluyó como control positivo un plásmido con una fusión *ompS1-lacZ*, la cual mostró cerca del 50% de la actividad de las fusiones anteriores. Estos niveles de expresión permiten visualizar a la proteína aun por tinción con azul de Coomassie (Oropeza et al., 1999), a diferencia de lo que sucede con BfpT y BfpV que no son detectados ni por marcaje con aminoácidos radioactivos. Esto sugiere que los niveles tanto de BfpT como de BfpV, son fuertemente controlados a nivel post-traducciona, tal vez involucrando tasas muy altas de degradación. Por otro lado, se ha visto que varios miembros de la familia AraC/XylS son altamente insolubles y muy difíciles de purificar, lo que podría deberse a su dominio de unión a DNA (Gallegos, et al., 1997).

Un resumen de los resultados obtenidos en este trabajo se presenta en la figura 11, donde mostramos que los genes del locus *bfpTVW*, descrito en forma independiente como locus *perABC* (Gómez-Duarte y Kaper, 1995), se encuentran formando un operón, ya que forman una unidad de regulación común, transcribiéndose en un solo mensajero. Los tres genes codifican para un producto. BfpT es una proteína que pertenece a la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS, el cual se autorregula positivamente (Martínez-Laguna et al., en prensa 1999). Esta característica se ha descrito para otros genes que codifican para activadores transcripcionales de dicha familia de proteínas, como *hrpB* (Genin et al., 1992), *rms* (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).

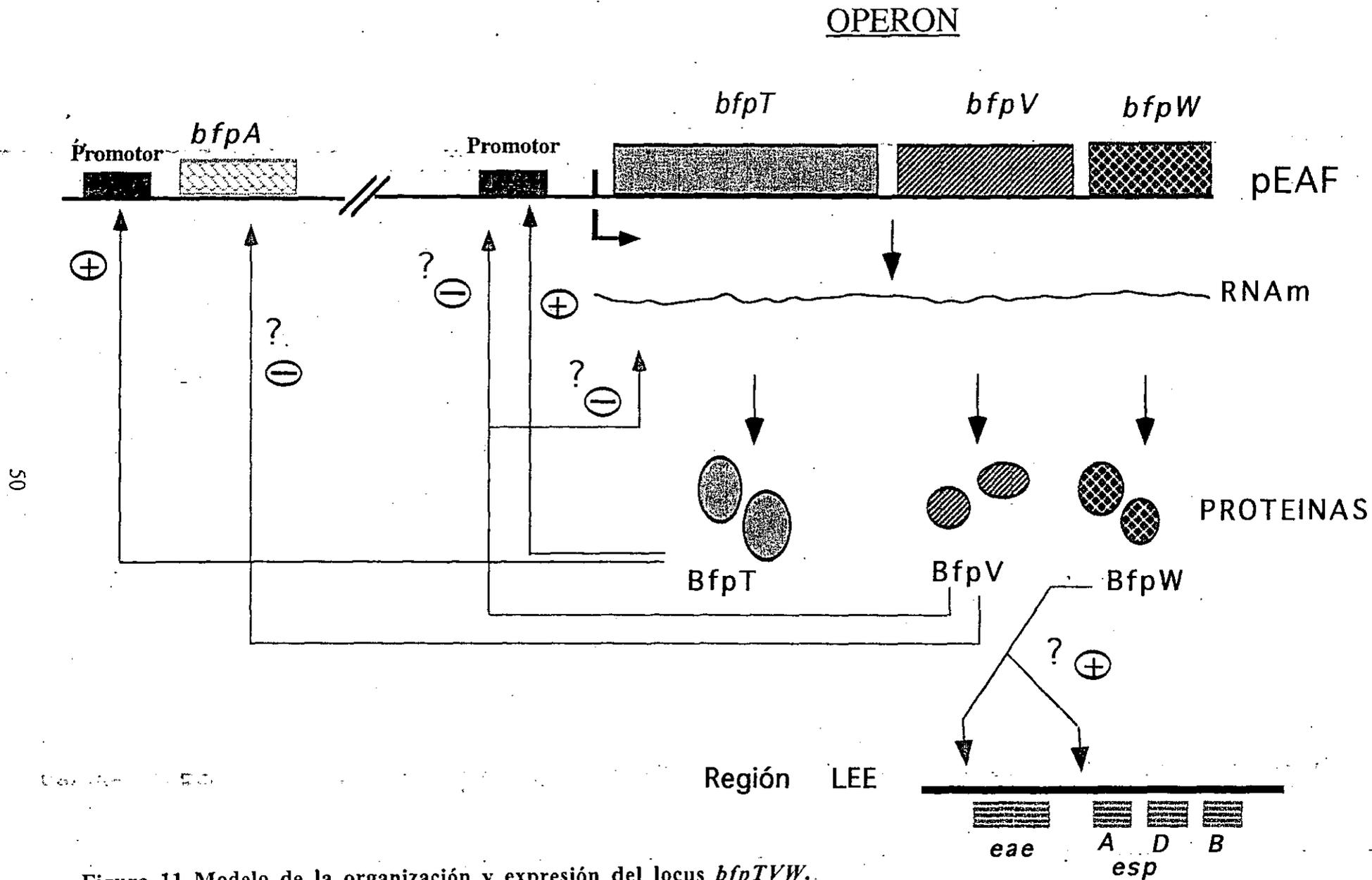


Figura 11 Modelo de la organización y expresión del locus *bfpTVW*.

La expresión de *bfpA* se activa a nivel transcripcional mediada por BfpT, regulándose ambos por temperatura, concentración de amonio y medio de crecimiento (Puente et al., 1996; Martínez-Laguna et al en prensa 1999). Las secuencias nucleotídicas de *bfpT* y *bfpA* muestran 73% de identidad en una región rica en A/T, localizada arriba de sus promotores, la cual fue necesaria para la regulación dependiente de BfpT en ambos genes (Bustamante et al., 1998) (Fig. 3). A este respecto, no se encontró homología entre la región reguladora de *bfpA* y *eae*, el gen que codifica para la intimina de EPEC, y el cual se reportó que es regulado por el producto de *bfpW* y no por BfpT (Gómez-Duarte y Kaper 1995). Por otra parte, trechos ricos en A/T, localizados arriba de la región de -35, se han implicado en la regulación de genes controlados por otras proteínas de la familia AraC, como Rns (Froehlich et al., 1994; Murphree et al., 1997), CfaD (Jordi et al., 1992), ToxT (Higgins y DiRita, 1994; Brown y Taylor, 1995) y VirF (Tobe et al., 1993).

Por otro lado, BfpV parece modular negativamente la expresión de *bfpA* y de *bfpT*, ya que en su ausencia se incrementa la expresión de *bfpA* dependiente de BfpT, y el nivel de RNAm de *bfpT* (Sánchez-SanMartín, datos no publicados). Así, el aumento en la expresión de *bfpA*, producido por la ausencia de *bfpV*, podría deberse a un incremento en la expresión de BfpT.

A BfpW se le ha involucrado en la regulación de algunos genes de la región LEE como el *eae* y los genes *esp* (Gómez-Duarte y Kaper 1995; Kenny y Finlay, 1995). A este respecto, la activación de dichos genes podría llevarse a cabo a través de BfpT, activando la expresión de BfpW. De manera interesante, a diferencia de lo antes mencionado, recientemente en el laboratorio se encontró que el gen *orf1*, localizado en la región LEE, activa la expresión de algunos genes como *tir*, *eae*, *sepZ* y *escV*; asimismo, se vió que la expresión de *tir/eae* no es dependiente de BfpW (Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados; Bustamante et al., datos no publicados). A la fecha no se conoce con detalle cómo se lleva a cabo esta regulación y el porqué de las diferencias entre lo reportado anteriormente y lo que se vió en el laboratorio, lo cual está por definirse.

BIBLIOGRAFIA

- Albert, J.M., Faruque, S.M., Faruque, A.S.G., Neogi, P.K.B., Ansaruzzaman, M., Bhuiyan, N.A., Alam, K., and Akbar, M.S. 1995. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. *J. Clin. Microbiol.* 33:973-977.
- Amábile-Cuevas, C.F., and Demple, B. 1991. Molecular characterization of the soxRS genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxido stress regulon. *Nucleic Acids. Res.* 19:4479-4484.
- Baldwin, T.J., Ward, W., Aitken, A., Knutton, S., and Williams, P.H. 1991. Elevation of intracellular free calcium levels in Hep-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 59:1599-1604.
- 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.
- Bustos, S.A., and Schleif, R.F. 1993. Functional domains of the AraC protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5638-5642.
- 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.
- Crane, J.K., and Oh, J.S. 1997. Activation of host cell protein kinase C by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 65:3277-3285.
- Cravioto, A., Gross, R.J., Scotlan, S.M. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* 3:95-99.
- 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.
- Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 60:3953-3961.
- 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.

- D'Orazio, S.E.F., and Collins, C.M.** 1995. UreR activates transcription of multiple promoters within the plasmid-encoded urease locus of the Enterobacteriaceae. *Mol. Microbiol.* 16:145-155.
- Dougan, G., and Kehoe, M.** 1984. The minicell system as a method for studying expression from plasmid-DNA. *Methods in Microbiology.* 17:233-257.
- 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.
- Foubister, V., Rosenshine, I., and Finlay, B.B.** 1994a. A diarrheal 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.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.
- 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.
- Giron, J.A., Ho, A.S.Y., and Schoolnik, G.K.** 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* 254:710-713.
- Gomes, T.A.T., Rassi, V., MacDonald, K.L., Ramos, S.R.T.S., Trabulsi, L.R., Vieira, M.A.M., Guth, B.E.C., Candeias, J.A.N., Ivey, C., Toledo, M.R.F., and Blake, P.A.** 1991. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo. *J. Infect. Dis.* 164:331-337.
- Gómez-Duarte, O.G., and Kaper, J.B.** 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeb* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63:1767-1776.
- 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., Giron, 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., 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.
- 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., and Finlay, B.B. 1997. Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1. *Infect.Immun.* 65:2528-2536.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A., and Finlay, B.B. 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell.* 91: 511-520.
- Knutton, S., Baldini, M.M., Kaper, J.B., and McNelsh, 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.
- Krieg, N.R., Holt, J.G. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed. Williams and Wilkins.
- 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.

Levine, M.M., Bergquist, E.J., Nailin, D.R., Waterman, D.H., Hornick, R.B., Young, C.R., Sotman, S., and Rowe, B. 1978. *Escherichia coli* strains that cause diarrhea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet.* I:1119-1122.

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.

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.* 339:521-532.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. 1982. "Molecular cloning". A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab. New York.

Mahadevan, S., and Wright, A. 1987. A bacterial gene involved in transcription antitermination: Regulation at a Rho-Independent Terminator in the *bgl* operon of *E. coli*. *Cell.* 50: 485-494.

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.

Martínez-Flores, I., Cano, R., Bustamente, V.H., Calva, E., and Puente, J.L. 1999. The *ompB* operon partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 181:556-562.

Martínez-Laguna, I., 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*. En prensa.

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

Menon, K.P., and Lee, N.L. 1990. Activation of ara operons by a truncated AraC protein does not require inducer. *Proc.Natl. Acad. Sci USA.* 87:3708-3712.

Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, N.Y.

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., Scaletsky, I.C.A., Kaper, J.B., Levine, M.M., and Trabulsi, L.R.** 1985. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 48:378-387.
- 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.
- 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.
- Oropeza, R., Sampieri, C.L., Puente, J.L., and Calva, E.** 1999. Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Mol. Microbiol.* 32: 243-252.
- Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W.J., and Schoolnik, G.K.** 1996. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli* : transcriptional regulation by environmental signals. *Mol. Microbiol.* 19:87-100.
- Raleigh, E.A., Lech, K., and Brent, R.** 1989. *Current protocols in Molecular Biology* eds. Ausubel, F.M., et al. Publishing Associates and Wiley Interscience; New York. Unit 1.4.
- Ramer, S.W., Bieber, D., Sohel, I., 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.
- Rothbaum, R.J., Partin, J.C., Saalfield, K., and McAdams, A.J.** 1983. An ultrastructural study of enteropathogenic *Escherichia coli* infection in human infants. *Ultrastruct. Pathol.* 4:291-304.
- 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.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463-5467.

- Savelkoul, P.H., Willshaw, G.A., McConnell, M.M., Smith, H.R., Hamers, A.M., van-der-Zeijst, B.A., and Gaastra, W. 1990. Expression of CFA/I fimbriae is positively regulated. *Microb. Pathog.* 8:91.
- Savkovic, S.D., Koutsouris, A. and Hecht, G. 1997. Activation of NF- κ B in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Am.J. Physiol.* 273:C1160-C1167.
- Silhavy, T.J., et al. 1984. *Experiments with Gene fusions* Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp xi-xii.
- Simons, R.W., Houman, F., and Kleckner. 1987. Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene.* 53:85-96.
- Sohel, I., Puente, J.L., Murray, W.J., Vuopio-Varkila, J., and Schoolnik, G.K. 1993. Cloning and characterization of the bundle-forming pilus 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., Cheng-Yenwu, 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.
- Studier, F.W., et al. 1990. *Meth. Enzymol.* 185:60-89.
- Subramony, M., and Wright, A. 1987. A bacterial gene involved in transcription antitermination:regulation at a Rho independent terminator in the *bgl* operon of *Escherichia coli*. *Cell.* 50:485-494.
- Taylor, K.A, O'connell, C.B., Luther, P.W., and Donnenberg, M.S. 1998. The EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is targeted to the cytoplasm of infected HeLa cells. *Infect.Immun.* 66:5501-5507.
- 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 the transcriptional 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, 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.

Zhang, H.Z., Lory, S., and Donnenberg, M.S. 1994. A plasmid-encoded prepilin peptidase gene from enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176:6885-6891.

Zhang, H.Z., and Donnenberg, M.S. 1996. DsbA is required for stability of the type IV pilin of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microb.* 21:787-797.