

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

00591  
16

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

293135

**Estudio sobre la regulación de la  
expresión de los genes *orf19*,  
*tir*, *cesT* y *eae* de *Escherichia  
coli* enteropatógena (EPEC).**

T E S I S

DE DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**Claudia Sánchez San Martín**

CUERNAVACA, MOR. MAYO DEL 2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



# Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

Biol. Claudia Sánchez San Martín  
P r e s e n t e.

Por este conducto me permito informarle que la Comisión Académica acordó asignarle el siguiente jurado de examen para obtener el grado de Doctora en Ciencias.

Presidente	Dra. Guadalupe Espín Ocampo
Secretario	Dr. José Luis Puente García
Vocal	Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos
Vocal	Dr. Lorenzo Segovia Forcella
Vocal	Dra. Gloria Soberón Chávez
Suplente	Dr. Enrique Merino Pérez
Suplente	Dr. Gullermo Gosset Lagarda

Sin mas por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuernavaca, Mor. a 18 de abril de 2001

Dr. Baltazar Becerril Luján  
Coordinador De Docencia



TELS. (52) (5) 6227600 TELS. (52) (73) 291600 FAX 172388

APDO. 510-3, CUERNAVACA, MORELOS 62250, MEXICO

Este trabajo se realizó en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. José Luis Puente García.

El comité tutorial estuvo conformado por:

Dr. José Luis Puente García.

Dr. Edmundo Calva Mercado.

Dra. Susana López Charretón.

Dr. Mario Rocha Sosa.

Dr. Joaquín Sánchez Castillo.

Durante el desarrollo del trabajo el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No.91904); de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM; del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudio de Posgrado de la UNAM (No. 030562); Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado de la UNAM (No.202363); por la Academia de la Investigación Científica; así como por El Instituto de Biotecnología de la UNAM.

## **AGRADECIMIENTOS**

A José Luis Puente, por brindarme su enseñanza y orientación y sobre todo por su amistad, confianza y apoyo invaluable.

Al Dr. Calva por sus enseñanzas y apoyo.

A Victor Bustamante, por su enseñanza y amistad.

A los comités tutoriales por su orientación y crítica.

Maestría:

Dr. José Luis Puente García.

Dr. Edmundo Calva Mercado.

Dr. Enrique Merino.

Dra. Gloria Soberón.

Dr. Daniel Segura.

Doctorado:

Dr. José Luis Puente García.

Dr. Edmundo Calva Mercado.

Dra. Susana López Charretón.

Dr. Mario Rocha Sosa.

Dr. Joaquín Sánchez Castillo.

Al jurado: por su asesoría y revisión del trabajo

Dr. José Luis Puente García.

Dra. Guadalupe Espin Ocampo.

Dr. Enrique Merino.

Dra. Gloria Soberón.

Dr. Miguel Angel Cevallos.

Dr. Lorenzo Segovia.

Dr. Guillermo Gosset.

A Martha Sosa Macías: Por los ensayos de RT-PCR

A todos los miembros del laboratorio Calva-Puente por su amistad, colaboración y crítica.

Al CONACyT, la UNAM y la Academia de Ciencias por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

## INDICE

	PAGINA
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRAC</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>4</b>
Regulación de los factores de virulencia de EPEC.	<b>13</b>
<b>JUSTIFICACION</b>	<b>15</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>16</b>
Cepas bacterianas	<b>17</b>
Plásmidos	<b>18</b>
Oligonucleótidos	<b>22</b>
Condiciones de crecimiento	<b>23</b>
Técnicas de biología molecular	<b>24</b>
Construcción de las fusiones transcripcionales	<b>25</b>
Construcción de plásmidos que contienen el locus <i>BfpTVW</i>	<b>25</b>
Aislamiento de RNA y análisis de extensión inversa	<b>26</b>
Ensayos de hibridación en canal	<b>27</b>
RT-PCR	<b>27</b>
Actividad de CAT	<b>28</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>29</b>
<b>Capítulo I . Regulación del operón <i>tir-cesT-eae (LEE5)</i>     y del gen <i>orf19</i> de EPEC</b>	<b>31</b>
OBJETIVOS	<b>32</b>
RESULTADOS ADICIONALES Y DISCUSION	<b>33</b>
CONCLUSIONES	<b>50</b>
PERSPECTIVAS	<b>52</b>
<b>Capítulo II. El operón <i>per (bfpTVW)</i> de EPEC.</b>	<b>54</b>
OBJETIVOS	<b>55</b>
RESULTADOS	<b>56</b>
DISCUSION	<b>70</b>
CONCLUSIONES	<b>73</b>
PERSPECTIVAS	<b>73</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO II</b>	<b>86</b>

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

		PAGINA
<b>TABLA 1</b>	CLASES DE <i>Escherichia coli</i> DIARREOGENICA	<b>5</b>
<b>TABLA 2</b>	CEPAS BACTERIANAS.	<b>17</b>
<b>TABLA 3</b>	PLASMIDOS.	<b>18</b>
<b>TABLA 4</b>	OLIGONUCLEOTIDOS.	<b>22</b>
<b>TABLA 5</b>	EFECTO DE MUTACIONES EN REGULADORES GLOBALES DE <i>Escherichia coli</i> SOBRE LA EXPRESION DEL OPERON <i>LEE5</i> Y <i>orf19</i> .	<b>37</b>
<b>TABLA 6</b>	REGULACION DE <i>bfpA-cat</i> en MC4100.	<b>67</b>
<b>TABLA 7</b>	REGULACION DE <i>bfpt-cat</i> en MC4100.	<b>68</b>
<b>TABLA 8</b>	REGULACION DE <i>bfpA-cat</i> en EPEC B171-10 (pEAF-).	<b>69</b>
<b>FIGURA 1</b>	MODELO DE INTERACCION DE EPEC CON CELULAS EPITELIALES.	<b>6</b>
<b>FIGURA 2</b>	REPRESENTACION DE LOS GENES DE <i>Escherichia coli</i> ENTEROPETOGENA.	<b>7</b>
<b>FIGURA 3</b>	LOS GENES <i>tir</i> , <i>cesT</i> Y <i>eae</i> FORMAN UN OPERON.	<b>34</b>
<b>FIGURA 4</b>	EFECTO DE LA FASE DE CRECIMIENTO EN LA EXPRESION DEL OPERON <i>LEE5</i> Y <i>orf19</i> .	<b>40</b>
<b>FIGURA 5</b>	PAPEL DEL PLASMIDO pEAF EN LA EXPRESION DEL OPERON <i>LEE5</i> Y <i>orf19</i> .	<b>41</b>
<b>FIGURA 6</b>	RESUMEN DE RESULTADOS.	<b>46</b>
<b>FIGURA 7</b>	MODELO DE REGULACION DE <i>LEE5</i> .	<b>47</b>
<b>FIGURA 8</b>	REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL OPERON <i>BfpTVW</i> .	<b>57</b>
<b>FIGURA 9</b>	EL PRODUCTO DE <i>bfpV</i> REGULA NEGATIVAMENTE LA EXPRESION DEL GEN <i>bfpA</i> .	<b>60</b>

- FIGURA 10** EL PRODUCTO DE *bfpV* REGULA NEGATIVAMENTE LA EXPRESION DEL GEN *bfpA* Y *bfpT*. 62
- FIGURA 11** EL PRODUCTO DE *bfpV* DISMINUYE LA CANTIDAD DE RNA MENSAJERO DEL GEN *bfpT*. 63
- FIGURA 12** EL EFECTO DEL GEN *bfpV* PUEDE SER COMPLEMENTADA EN *trans*. 65



## RESUMEN

*Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) es una causa importante de diarrea infantil en países en desarrollo. Esta bacteria coloniza el intestino delgado y promueve la lesión denominada A/E (Attaching and effacing). Esta lesión se caracteriza por la destrucción de microvellosidades, cambios drásticos en la arquitectura del citoesqueleto y reorganización de actina para la formación de una estructura en forma de pedestal a la que la bacteria se une íntimamente. Para establecer esta interacción con la superficie de la célula epitelial, EPEC produce la proteína bacteriana Tir, la cual se transloca e inserta en la membrana celular y actúa como receptor para la proteína íntima, localizada en la membrana externa de EPEC. El gen *tir* se localiza en el locus LEE, corriente abajo del gen *orf19* y corriente arriba de los genes *cesT*, el cual codifica para la chaperona de Tir, y *eae*, el cual codifica para la íntima. En el presente trabajo, demostramos que los genes *tir*, *cesT* y *eae* forman un operón, y que el gen *orf19* forma una unidad transcripcional monocistrónica independiente. Asimismo, nuestros resultados muestran que la proteína Ler (LEE-encoded regulator) se requiere para la activación del operón *tir* y del gen *orf19*, y que la secuencia que se localiza entre -204 y -157, a partir del inicio de transcripción de *tir*, se necesita para dicha activación. La expresión máxima del operón *tir* y del gen *orf19* se observó en DME (Dulbecco's modified Eagle's medium) a 37°C y se reprimió por condiciones en el ambiente tales como el medio de cultivo rico (LB), por temperaturas de crecimiento mayores y menores a los 37°C, y por la concentración de amonio en el medio. En el caso de *tir*, la represión observada a temperaturas de crecimiento por debajo de 37°C o en medio rico (LB), se ejerció directamente sobre el promotor. La represión observada en presencia de amonio o a temperaturas por arriba de los 37°C involucró elementos específicos en *cis* localizados entre los nucleótidos -157 y -204, y -122 y -157, respectivamente. Por otro lado, la remoción de elementos reguladores localizados entre los nucleótidos -204 y -97, permite que el promotor de *tir* se exprese en ausencia de Ler, sugiriendo que Ler libera la represión ejercida por

un regulador negativo que está conservado en *E. coli* K12. El análisis de la expresión del operón *tir* y *orf19* en cepas de *E. coli* K12 mutantes en diversos reguladores globales, mostró que la expresión de *orf19* se reprime por la proteína H-NS, y que reguladores tales como IHF, RpoN, RpoS, Fis, CRP, LRP, Fur, StpA y la misma H-NS, no están involucrados en la represión de *tir*.

### ABSTRACT

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a major cause of acute and persistent infantile diarrhea in developing countries. EPEC colonize the intestine and promotes the attaching and effacing lesion (A/E). This lesion is characterized by the destruction of the microvilli, drastic changes in the cytoskeleton architecture and actin reorganization in pedestal-like structures upon which the bacteria attach intimately. To establish this intimate interaction with the host epithelial cell surface EPEC produces Tir, a bacterial protein that upon translocation and insertion into the epithelial cell membrane constitutes the receptor for intimin, an outer membrane protein of EPEC. The *tir* gene is encoded by the locus for enterocyte effacement (LEE) where it is flanked upstream by *orf19* and downstream by the *cesT*, which code for the Tir chaperone, and *eae* that encodes the intimin. In this work we have determined that *tir*, *cesT* and *eae* form an operon, which is under the control of a promoter located upstream from *tir*, and that the *orf19* gene is transcribed as a monocistronic unit. As well, our results demonstrated that the LEE-encoded regulator Ler was required for the efficient activation of both the *tir* and the *orf19* promoters, and that a sequence motif located between positions -204 to -157 was needed for the Ler-dependent activation of the *tir* operon.

In addition, the full expression of *tir* operon and *orf19* was observed in DME (Dulbecco's modified Eagle's medium) at 37°C, and it was repressed by environmental conditions such as rich culture medium (LB), growth temperature over and under 37°C, and ammonium concentration in the medium. The *tir* operon repression exerted by low temperature or rich culture medium was

un regulador negativo que está conservado en *E. coli* K12. El análisis de la expresión del operón *tir* y *orf19* en cepas de *E. coli* K12 mutantes en diversos reguladores globales, mostró que la expresión de *orf19* se reprime por la proteína H-NS, y que reguladores tales como IHF, RpoN, RpoS, Fis, CRP, LRP, Fur, StpA y la misma H-NS, no están involucrados en la represión de *tir*.

### ABSTRACT

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a major cause of acute and persistent infantile diarrhea in developing countries. EPEC colonize the intestine and promotes the attaching and effacing lesion (A/E). This lesion is characterized by the destruction of the microvilli, drastic changes in the cytoskeleton architecture and actin reorganization in pedestal-like structures upon which the bacteria attach intimately. To establish this intimate interaction with the host epithelial cell surface EPEC produces Tir, a bacterial protein that upon translocation and insertion into the epithelial cell membrane constitutes the receptor for intimin, an outer membrane protein of EPEC. The *tir* gene is encoded by the locus for enterocyte effacement (LEE) where it is flanked upstream by *orf19* and downstream by the *cesT*, which code for the Tir chaperone, and *eae* that encodes the intimin. In this work we have determined that *tir*, *cesT* and *eae* form an operon, which is under the control of a promoter located upstream from *tir*, and that the *orf19* gene is transcribed as a monocistronic unit. As well, our results demonstrated that the LEE-encoded regulator Ler was required for the efficient activation of both the *tir* and the *orf19* promoters, and that a sequence motif located between positions -204 to -157 was needed for the Ler-dependent activation of the *tir* operon.

In addition, the full expression of *tir* operon and *orf19* was observed in DME (Dulbecco's modified Eagle's medium) at 37°C, and it was repressed by environmental conditions such as rich culture medium (LB), growth temperature over and under 37°C, and ammonium concentration in the medium. The *tir* operon repression exerted by low temperature or rich culture medium was

observed to act directly on the promoter. The repression exerted by ammonium or high temperature involved specific *cis*-acting elements located between positions –157 y –204, and –122 y –157, respectively. Furthermore, the deletion of sequence elements located between positions –204 and –97 rendered an active *tir* promoter in absence of Ler, which indicates *tir* expression is subjected to a repression mechanism, present in *E. coli* K12, that is counteracted by Ler. The analysis of the *tir* operon and *orf19* expression in a series of *E. coli* mutants in different global regulators, shown that H-NS protein repressed the *orf19* expression, and regulators such as H-NS, IHF, RpoN, RpoS, Fis, CRP, LRP, and Fur were not involved in the *tir* operon repression.

## INTRODUCCION

Las cepas de *Escherichia coli* involucradas en enfermedades gastrointestinales, se han clasificado de acuerdo a sus factores de virulencia, a sus patrones de adherencia a células hospederas, a su histopatología y a su producción de toxinas. Con base en estos criterios, las clases principales son: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* difusoadherente (DAEC) (Levine *et al.*, 1978; Levine, 1987; Nataro y Kaper, 1998) (Tabla 1).

EPEC fue uno de los primeros grupos asociados a diarrea en humanos y en la actualidad sigue siendo una de las principales causas de diarrea infantil, así como una causa importante de muerte en niños menores de un año, principalmente en países en desarrollo (Robins-Browne, 1987; Law, 1994; Nataro y Kaper, 1998).

La interacción de EPEC con las células epiteliales se ha estudiado ampliamente, lo que ha permitido proponer que el proceso se lleva a cabo en tres etapas (Fig. 1) (Donnenberg *et al.*, 1997; Frankel *et al.*, 1998; Nataro y Kaper, 1998; DeVinney *et al.*, 1999). El paso inicial involucra un fenotipo denominado adherencia localizada (AL), el cual se ha observado en biopsias obtenidas del intestino de niños infectados con EPEC, y que se caracteriza por la unión no íntima de microcolonias de EPEC a la superficie de la célula epitelial (Cravioto *et al.*, 1979; Scaletsky *et al.*, 1984; Vuopio-Varkila y Schoolnik, 1991). La AL es considerada un rasgo característico de los serotipos clásicos de EPEC y está asociada con la producción de una fimbria denominada BFP (Bundle-forming pili), la cual forma una red que mantiene unidas a las bacterias, y da estabilidad a las microcolonias (Nataro *et al.*, 1987; Giron *et al.*, 1991). Los genes requeridos para la producción del BFP están codificados en el operón *bfp*, el cual se localiza en el plásmido pEAF (EPEC adherence factor) (Fig. 2) (Sohel *et al.*, 1996; Stone *et al.*, 1996; Tobe *et al.*, 1999a).

**TABLA 1**

**CLASES PRINCIPALES DE *Escherichia coli* DIARREOGENICA\***

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

a) Revisado y actualizado de Levine y Edelman, 1984; Nataro y Kaper, 1998.

b) Modificado de Low et al, 1996.

c) Modificado de Polotsky, 1994.

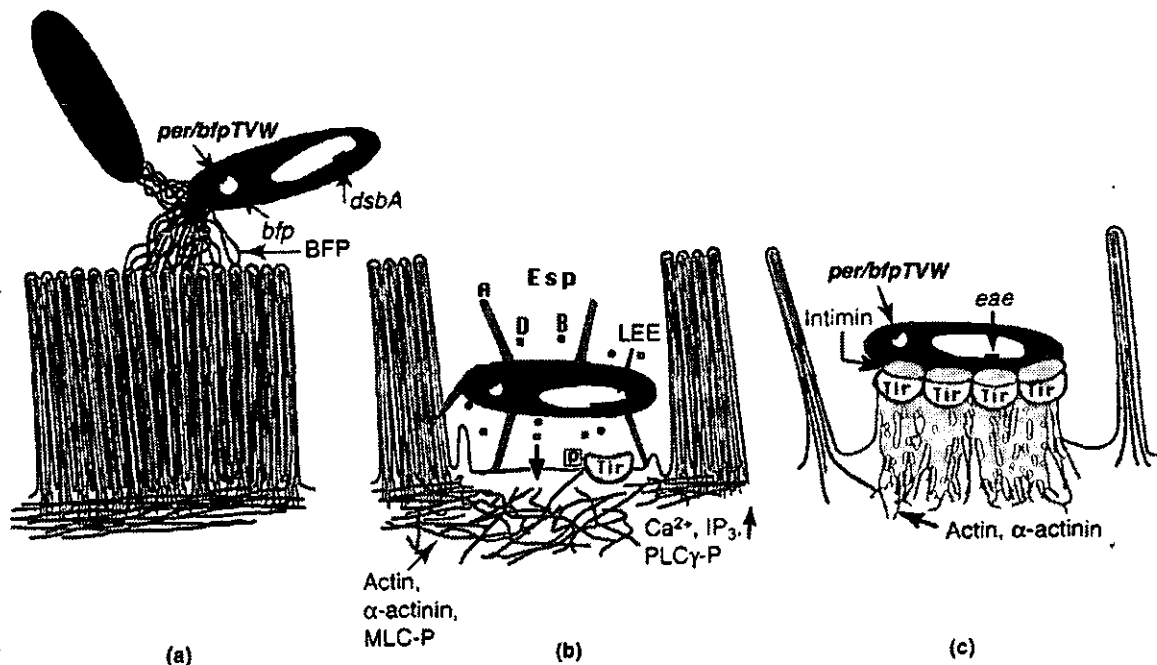


Fig. 1. Modelo de la interacción de EPEC con células epiteliales. a) Adherencia localizada. Involucra a la fimbria BFP, codificada por el operón *bfp*, localizado en el plásmido pEAF. La expresión de *bfp* depende del locus *bfpTVW*. El producto del gen *dsbA* es necesario para el adecuado ensamblaje de BfpA, la subunidad estructural principal de BFP. BFP promueve la formación de microcolonias y la adherencia a las células epiteliales. b) En la segunda etapa EPEC secreta las proteínas Esp, Tir y Map (producto del gen *orf19*). EspA forma un filamento necesario para la transferencia de proteínas, EspB y EspD conforman parte del aparato de transferencia. Tir es transferida al interior de las células epiteliales donde es fosforilada y actúa como el receptor de EPEC. EPEC también genera cambios en la transducción de señales, y en los niveles de inositol fosfato y calcio intracelulares, así como la acumulación de actina, alfa-actinina, talina y ezrina por debajo del sitio de unión de la bacteria. Además se promueve la fosforilación y defosforilación de proteínas del hospedero, como la fosfolipasa C. Se propone que estos cambios generan la destrucción de las microvellosidades. c) La adherencia íntima se da a través de la interacción del receptor Tir fosforilado con una proteína de membrana externa de la bacteria llamada intimina. Esta unión promueve la reorganización de proteínas del citoesqueleto formando una estructura llamada de tallo o pedestal. Al conjunto de eventos que originan la adherencia íntima y la destrucción de microvellosidades se conoce como fenotipo A/E ("Attaching and effacing") (Tomado de Donnenberg et al., 1997 y modificado; Nataro and Kaper, 1998).

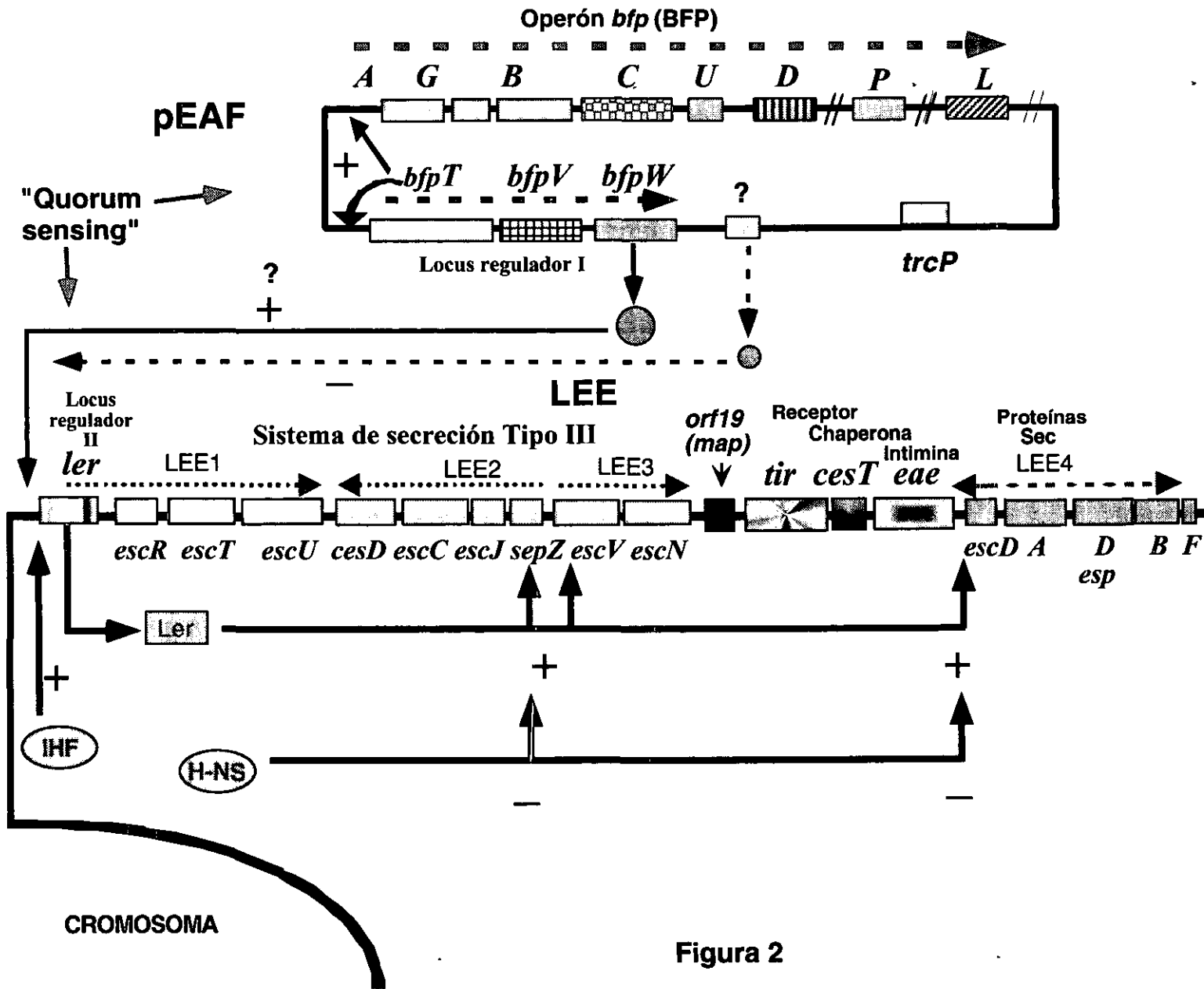


Figura 2



**Fig. 2. Representación de los genes de *Escherichia coli* enteropatógena involucrados en la interacción con células hospederas, y de los mecanismos que regulan su expresión.** El plásmido pEAF, esquematizado en la parte superior, contiene al operón *bfp* (11.5 kb) que codifica para la fimbria BFP (Sohel *et al.*, 1996) y el operón *bfpTVW*, o locus regulador I, que codifica para la proteína BfpT, activador transcripcional del operón *bfp* (Tobe *et al.*, 1996), así como el gen *trcP*, cuyo producto presenta homología con TrcA (Tobe *et al.*, 1999a; Tobe *et al.*, 1999b). En el cromosoma de EPEC se ha localizado la isla de patogenicidad LEE ("locus of enterocyte effacement") (McDaniel *et al.*, 1995), que es necesaria para la formación de la lesión A/E (McDaniel and Kaper, 1997). Esta región contiene 41 fases abiertas de lectura que incluyen genes involucrados en la transducción de señales y la adherencia íntima, los cuales han sido organizados en operones. LEE1 codifica para el locus regulador II que contiene al gen *ler*, el cual es regulado por IHF y por el producto del gen *bfpW*. Dentro de LEE1 también se encuentran codificados algunos de los elementos del sistema de secreción tipo III, que en conjunto son codificados por los operones LEE2 y LEE3, son los encargados de secretar y translocar las proteínas Esp, codificadas por el operón LEE4, así como, la proteína Tir. Ler presenta homología con la proteína H-NS y regula los operones LEE2, LEE3, LEE4 (Sperandio *et al.*, 2000; Bustamante *et al.*, 2001). Recientemente se determinó que H-NS reprime la expresión de los operones LEE2 y LEE3 (Bustamante *et al.*, 2001). Los genes del LEE también son regulados por el mecanismo denominado "quorum sensing" (detección en grupo) (Sperandio *et al.*, 1999).

La subunidad estructural principal de BFP, denominada BfpA, tiene homología con las proteínas que conforman la familia de pilis tipo IV, y que están presentes en organismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, ETEC, *Moraxella bovis* y *Vibrio cholerae* (Sohel *et al.*, 1993). Los productos de los genes *bfp*, localizados corriente abajo de *bfpA*, comparten similitud con proteínas accesorias requeridas para la producción de este tipo de pili en otros microorganismos, y para la secreción de proteínas por el sistema tipo II, dependiente de los genes *sec* (Ramer *et al.*, 1996; Sohel *et al.*, 1996; Stone *et al.*, 1996).

El segundo paso en la infección por EPEC se caracteriza por la inducción de una serie de rutas de transducción de señales en la célula eucarionte. Entre los efectos generados está el aumento en los niveles de calcio intracelular de células epiteliales en cultivo (Baldwin *et al.*, 1991; Baldwin *et al.*, 1993; Dytoc *et al.*, 1994; Philpott *et al.*, 1996; Bain *et al.*, 1998). Otro evento desarrollado en este paso de la infección es la lesión denominada AE (Ataching and effacing), que se caracteriza por la destrucción de las microvellosidades, por la generación de cambios drásticos en la arquitectura del citoesqueleto y por la reorganización de los filamentos de actina. Se propone que dichos cambios puedan generar la respuesta secretoria que produce EPEC en el intestino, ya que el incremento de calcio intracelular puede inhibir la absorción de Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup> y estimula la secreción de cloro en enterocitos (revisado por Nataro y Kaper, 1998).

La unión de EPEC a células en cultivo también produce un aumento en la liberación de inositol fosfato, incluyendo 1,4,5-inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e IP<sub>4</sub> (Dytoc *et al.*, 1994; Foubister *et al.*, 1994b; Nataro y Kaper, 1998). Este aumento es consistente con la observación de que EPEC promueve la activación de la fosfolipasa C- $\gamma$ 1 (Kenny y Finlay, 1997). Por otro lado, existe evidencia de que el calcio puede liberarse de pozas intracelulares que responden a aumentos en IP<sub>3</sub>.

La unión de EPEC a las células epiteliales genera la fosforilación de varias proteínas en residuos de treonina y serina, dentro de las cuales se ha descrito la cadena ligera de la miosina (Manjarrez-Hernandez *et al.*, 1992;

Manjarrez-Hernandez *et al.*, 1996). La activación de las cinasas PKC y la Cinasa de la cadena ligera de la miosina se produce durante el desarrollo de la patogénesis por EPEC (Baldwin *et al.*, 1990; Manjarrez-Hernandez *et al.*, 1996). La activación de la cinasa PKC induce cambios en la secreción de electrolitos *in vivo* e *in vitro* y la fosforilación de la cadena ligera de la miosina podría incrementar la permeabilidad de las uniones íntimas ("tight junctions") que presentan las células epiteliales (Manjarrez-Hernandez *et al.*, 1996), siendo ésta otra posible explicación para el mecanismo de la diarrea originada por EPEC.

Por otro lado, una serie de proteínas son fosforiladas en residuos de tirosina. Dentro de éstas se encuentra la proteína Tir, producida y translocada por EPEC hacia el interior de la célula hospedera donde se fosforila, se inserta en la membrana celular y se expone hacia el exterior de la célula (Kenny *et al.*, 1997). Por último, se ha observado que la infección por EPEC genera la migración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) hacia la capa de células epiteliales, y la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual estimula la expresión de la citocina IL-8, un quimioatrayente de los PMN (Savkovic *et al.*, 1997).

En el tercer paso de la infección, EPEC se adhiere íntimamente a la superficie de la célula a través de la unión de Tir con la proteína de membrana externa intimina. Esta interacción promueve la reorganización de los filamentos de actina y otras proteínas del citoesqueleto como actinina, ezrina, talina y cadenas ligeras de miosina, justo por debajo de la célula bacteriana adherida, dando lugar a la formación de una estructura en forma de copa o pedestal al que EPEC se une estrechamente (Frankel *et al.*, 1998; Nataro y Kaper, 1998; DeVinney *et al.*, 1999). La formación de estos pedestales es dinámica y se ha observado por videomicroscopía que pueden doblarse y ondularse, así como cambiar de tamaño. Además, las bacterias unidas pueden moverse a lo largo de la superficie de la célula epitelial en cultivo (Sanger *et al.*, 1996); sin embargo, hasta el momento no se ha determinado cuál podría ser la finalidad de este fenotipo durante la infección.

Los determinantes de virulencia de EPEC requeridos para la inducción de la transducción de las señales y de la lesión A/E están codificados en una isla de patogenicidad denominada LEE (Locus of Enterocyte Effacement) (Fig. 2), y que contiene 41 marcos abiertos de lectura (ORFs) probables. Esta región también se encuentra en otros organismos que producen lesiones tipo A/E, como son, *Hafnia alvei*, *Citrobacter rodentium*, *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) y *Escherichia coli* patógena específica de conejo (RDEC-1) (McDaniel *et al.*, 1995; McDaniel y Kaper, 1997; Elliott *et al.*, 1998).

Con base en el análisis de secuencia y estudios recientes, la mayoría de los genes del LEE se han clasificado en tres grupos funcionales (Fig. 2). Los genes *esc* y *sep* que codifican para el sistema de secreción y translocación tipo III (Jarvis *et al.*, 1995); los genes *tir*, *cestT*, y *eae*, que codifican para las proteínas involucradas en la unión íntima (Jerse *et al.*, 1990; Kenny *et al.*, 1997; Abe *et al.*, 1999; Elliott *et al.*, 1999); y los genes *esp*, los cuales codifican para los efectores involucrados en la formación de un "translocón" o aparato de translocación, para la liberación de moléculas efectoras y en la inducción de la transducción de señales dentro de la célula hospedera (Foubister *et al.*, 1994a; Kenny y Finlay, 1995; Kenny *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 1997; Knutton *et al.*, 1998; Wolff *et al.*, 1998).

El gen *tir* codifica para la proteína Tir (Translocated Intimin Receptor), la cual es transferida a la célula hospedera donde se fosforila e inserta en la membrana (Kenny *et al.*, 1997). Tir requiere de las proteínas EspA y EspB y del sistema de secreción tipo III para su transferencia. (Knutton *et al.*, 1998; Wolff *et al.*, 1998; Warawa *et al.*, 1999). Hasta ahora se han identificado tres funciones para Tir (Kenny *et al.*, 1997). Esta proteína actúa como el receptor para la intimina, una proteína de membrana externa necesaria para la adherencia íntima a las células epiteliales y que está codificada en el gen *eae* (Jerse *et al.*, 1990). La segunda función de Tir es la nucleación de la actina y otros componentes del citoesqueleto después de la unión a intimina. La tercera función es la transmisión de señales adicionales a la célula hospedera una vez que ocurre la interacción Tir-intimina.

Recientemente, se caracterizó el producto del gen *orfU*, localizado entre *tir* y *eae*, como una proteína chaperona de Tir, y que se denominó Cest (chaperone for EPEC secreted protein Tir) (Abe *et al.*, 1999; Elliott *et al.*, 1999).

Corriente arriba de *tir*, se localiza el gen *orf19*, el cual tiene homología con *trcA* y *trcP*. El gen *trcA* se localiza en el cromosoma de EPEC, en una región descrita recientemente como isla de patogenicidad LIM (Locus of improving microcolony-formation). TrcA es una proteína parecida a chaperonas, y que se propone que interacciona con la intimina y con BfpA en la formación de microcolonias. El gen *trcP*, descrito recientemente, está localizado en el plásmido pEAF, 4.2 kb corriente abajo del operón *bfpA-L*, pero no se le ha asociado ningún papel en virulencia. Los productos de los genes *orf19*, *trcA* y *trcP* presentan similitud con IpgB, una proteína codificada en un plásmido de virulencia en *Shigella flexneri* cuya función aún se desconoce (Tobe *et al.*, 1999a; Tobe *et al.*, 1999b). Muy recientemente, se ha reportado que el producto de *orf19* también se secreta por el sistema de secreción tipo III, codificado en el LEE, y su blanco de acción es la mitocondria de la célula hospedera, por lo que ha sido renombrado *map* (mitochondrial associated protein). Aunque aún no es claro el papel de Map, se propone que esta proteína modifica el potencial de membrana de la mitocondria, afectando, probablemente, la liberación de efectores preapoptóticos, o las concentraciones de ATP/ADP (Kenny y Mark, 2000).

Hasta el momento se han descrito cinco proteínas Esp: A-D y F. EspA forma organelos filamentosos en la superficie celular, los cuales funcionan como puentes de unión entre la bacteria y la célula hospedera, y se requieren para la translocación de la proteína EspB (Kenny *et al.*, 1996; Knutton *et al.*, 1998). EspB y EspD son necesarias para iniciar la cascada de transducción de señales en la célula hospedera, y para la producción de la lesión AE (Donnenberg *et al.*, 1993; Foubister *et al.*, 1994a). Se ha demostrado que EspB se transloca al citoplasma celular y tiene un efecto directo en la organización de los filamentos de actina (Taylor *et al.*, 1999). Por otro lado, recientemente se reportó que EspA y EspB interaccionan entre sí y son necesarias para la

translocación de Tir a la célula hospedera, se sugiere que ambas pueden formar parte del aparato de translocación del sistema de secreción tipo III (Hartland *et al.*, 2000). EspC codifica para una proteína parecida a las proteasas de inmunoglobulina A, no se secreta por el sistema de secreción tipo III y no tiene un papel en la producción de la lesión A/E (Stein *et al.*, 1996); sin embargo, forma parte de la tercera isla de patogenicidad descrita en EPEC (Mellies *et al.*, 2001). Finalmente, la proteína EspF, se secreta por el sistema de secreción tipo III, pero no es necesaria para la lesión A/E (McNamara y Donnenberg, 1998):

Los fenotipos de adherencia localizada (AL) y A/E distinguen a EPEC de otras clases de *E. coli* patógenas, y se han observado tanto *in vitro* como *in vivo* (Nataro y Kaper, 1998).

### **Regulación de los factores de virulencia de EPEC.**

Los mecanismos reguladores que coordinan la expresión de los genes de virulencia de EPEC han comenzado a ser aclarados recientemente; varios de estos estudios fueron publicados durante el desarrollo de este trabajo (Fig. 2). La expresión del operón *bfp* se regula positivamente por la proteína BfpT (Puente *et al.*, 1996; Tobe *et al.*, 1996), un miembro de la familia de activadores de la transcripción AraC/XylS, codificado por el operón *bfpTVW* (Sosa, 1999; Tobe *et al.*, 1996), y localizado en el plásmido pEAF. Este locus también ha sido descrito como locus *perABC* (Gómez-Duarte y Kaper, 1995), sin embargo por razones prácticas en esta tesis será nombrado sólo como locus *bfpTVW*. Por otro lado, BfpT activa su propio promotor y es también regulado por condiciones ambientales (Martínez-Laguna *et al.*, 1999). Al estudiar el papel de los genes *bfpTVW* se ha observado que *bfpV* tiene un efecto negativo sobre la transcripción de *bfpA* (Bustamante, 1998 y este trabajo). El locus *bfpTVW* participa en la regulación negativa de la expresión de la intimina (Knutton *et al.*, 1997), y aumentar la transcripción de los genes de LEE (Gómez-Duarte y Kaper, 1995; Mellies *et al.*, 1999), así como otros genes codificados en el cromosoma de EPEC como *trcA* (Tobe *et al.*, 1999b). Como se puede ver, aún no está completamente claro cuál es el papel que juega este locus en la regulación de

la expresión de los genes del plásmido EAF, o los de la región LEE, ni su mecanismo de acción.

Estudios recientes han demostrado que los genes codificados en el LEE están organizados en 5 operones principalmente (Elliott *et al.*, 1999; Mellies *et al.*, 1999; Sánchez-SanMartín *et al.*, 1999; Sánchez-SanMartín *et al.*, 2001). Los operones *LEE1*, *LEE2* y *LEE3*, contienen los genes *esc* y *sep*; el operón *LEE4* codifica para las proteínas secretadas *Esp*; y, como demostramos en este trabajo, los genes *tir*, *cesT* y *eae* conforman el operón *LEE5*. Estos estudios han demostrado también que la proteína *Ler* actúa como regulador positivo de la transcripción de dichos operones (Friedberg *et al.*, 1999; Mellies *et al.*, 1999; Bustamante *et al.*, 2001). *Ler* presenta similitud con la proteína reguladora H-NS, y es el primer gen del operón *LEE1*. El factor de integración IHF (Friedberg *et al.*, 1999) y el autoinductor *LuxS*, involucrado en el fenotipo de "detección en grupo" ("quorum-sensing") (Sperandio *et al.*, 1999), también se requieren para la activación eficiente de genes codificados en el LEE (Fig. 2). Se ha propuesto que *Ler* libera la represión que ejerce H-NS sobre la expresión de los operones *LEE2* a *LEE4* (Bustamante *et al.*, 2001). Recientemente, durante el desarrollo de este trabajo, se demostró que *Ler* también es necesario para activar la expresión de los genes *rorf2*, *orf10*, *rorf10* *orf19* y *espF* localizados en el LEE (Elliott *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que algunos de los factores de virulencia de EPEC son regulados por diferentes condiciones de crecimiento. En general, se ha visto que la expresión de los genes *esp*, del operón *bfp*, los genes del sistema de secreción tipo III y los genes que codifican para las proteínas reguladoras, es óptima en medio de cultivo de células como DME a 37°C, y se reprime en condiciones de crecimiento en medio de cultivo rico, como LB, a temperaturas mayores y menores a los 37°C, así como por concentraciones milimolares de amonio en el medio (Vuopio-Varkila y Schoolnik, 1991; Kenny y Finlay, 1995; Puente *et al.*, 1996; Bustamante *et al.*, 1998; Martínez-Laguna *et al.*, 1999).

## JUSTIFICACION

EPEC fue la primera bacteria que se demostró es capaz de producir su propio receptor. Este es translocado por un sistema de secreción tipo III. Para su secreción Tir requiere de la proteína chaperona CesT, la cual está codificada por un gen aledaño a *tir*. Tir interactúa directamente con la proteína intimina localizada en la membrana externa de EPEC. Estos elementos son efectores indispensables para que la lesión A/E se desarrolle, y esta lesión es, a la vez, un rasgo característico de la patogénesis generada por EPEC.

Nuestro interés general es estudiar la expresión de factores de virulencia de EPEC así como de los elementos que la regulan, lo que permitirá entender mejor las condiciones necesarias para que se desarrolle una infección por EPEC. Para esto hemos tomado como materia de estudio los genes *orf19*, *tir*, *cesT* y *eae*. La información con la que se contaba sobre la regulación de estos genes al inicio del trabajo era escasa y controversial. En este trabajo, definimos la organización transcripcional de los genes *orf19*, *tir*, *cesT* y *eae* de EPEC. Asimismo, mostramos que la transcripción de estos genes requiere de la proteína Ler, la cual libera la represión ejercida por una proteína represora que se encuentra presente en *E. coli* K12. También mostramos que diferentes elementos actuando en *cis* están involucrados en la regulación negativa y positiva de la expresión de *tir* por diferentes elementos reguladores y condiciones ambientales. Adicionalmente, se estudio del papel del operón *bfpTVW* en la regulación de los factores de virulencia de EPEC.

Los resultados obtenidos aportan información para el entendimiento de la biología de la patogénesis generada por EPEC, resaltan la importancia de que los genes de virulencia sean expresados de manera coordinada y respondan a las mismas condiciones del ambiente y, junto con otros estudios recientes, ha permitido proponer un modelo de regulación (Fig. 2, 6 y 7). Este modelo presenta elementos actuando de manera global sobre la expresión de los genes de virulencia, pero también presenta diferencias particulares que pueden ser importantes a nivel biológico.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Tabla 2**  
**CEPAS BACTERIANAS**

E2348/69	EPEC O127:H6; contiene el plásmido pEAF (69 kb) y el plásmido críptico (3 kb) (Levine <i>et al.</i> , 1978).
JPN15	Cepa derivada de E2348/69, que carece del plásmido pEAF (Jerse <i>et al.</i> , 1990).
E2348/69 $\Delta$ ler	Cepa mutante en <i>ler</i> , (sustracción en fase de <i>ler</i> ) derivada de E2348/69 (Bustamante <i>et al.</i> , 2001).
B171-8	EPEC O111:NM contiene el pEAF (Puente <i>et al.</i> , 1996).
B171-10	Cepa carente (curada espontáneamente) del pEAF y del plásmido críptico (3.0 kb), derivada de B171-8 (Bustamante <i>et al.</i> , 1998, y este estudio).
EDL933	EHEC O157:H7 (Riley <i>et al.</i> , 1983).
MC4100	Cepa de laboratorio derivada de <i>E. coli</i> K12 F- <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> ) <i>U169 rpsL150 relA1 deoC1 rbsR fth5301fruF25</i> $\lambda$ - (Casadaban, 1976).
CSH56	Cepa de laboratorio derivada de <i>E. coli</i> K12 <i>lac-pro supD nalA thi</i> (Yamada <i>et al.</i> , 1991).
CSH56 $\Delta$ H-NS	Cepa derivada de CSH56, la cual contiene la sustracción del gen <i>hns</i> (Km <sup>r</sup> ) (Yamada <i>et al.</i> , 1991).
N99	Cepa de laboratorio derivada de <i>E. coli</i> K12 F- <i>galk2 rpsL</i> $\lambda$ - (Gottesman y Yarmolinsky, 1968).
K5185 IHF <sup>-</sup>	N99 $\Delta$ <i>himA</i> (Tet <sup>r</sup> ) (Friden <i>et al.</i> , 1984).
RO64 LRP <sup>-</sup>	MC4100 <i>lrp-201::Tn10</i> (Lange <i>et al.</i> , 1993).
MCG007	MC4100 <i>rpoS::Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> ) (Colección de Carmen Gómez, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México).

### Tabla 2 continuación.

#### CEPAS BACTERIANAS

MCG009 <sup>-</sup>	MC4100 <i>fis::kan</i> (Km <sup>r</sup> ) (Colección de Carmen Gómez Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México).
ET8000	Cepa de laboratorio derivada de <i>E. coli</i> K12. <i>rbs lacZ::IS1 gyrA hutC<sub>K</sub><sup>C</sup> Mu, cts62</i> (Guterman y Howitt, 1979).
ET8045	ET8000 <i>rpoN208::Tn10</i> (Km <sup>r</sup> ) (Cava <i>et al.</i> , 1989).
GS480Δ900	MC4100 <i>malP::neo Δ(envZ-malP)</i> 900 (Garrett <i>et al.</i> , 1985).
IMSS 1	Cepa clínica de referencia de <i>Salmonella typhi</i> aislada en México. Serotipo 9, 12, d, Vi. (Puente <i>et al.</i> , 1987).
SM796	<i>F araD139 Δ(araABC-leu)7697 galE galK Δ(lac) X74 rpsL thi phoA ΔPvull phpR</i> (Sm <sup>r</sup> ) (Calderwood y Mekalanos, 1988).
SBC796	SM796 <i>fur::Tn5</i> ; (Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> ) (Calderwood y Mekalanos, 1988).

### Tabla 3

#### PLÁSMIDOS

pKK232-8	Derivado de pBR322 conteniendo el gen reportero de la cloramfenicol acetil transferasa ( <i>cat</i> ) sin promotor, Amp <sup>r</sup> (Brosius, 1984).
pCAT232	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>bfpA-cat</i> a partir de los nucleótidos -232 a +76 (Puente <i>et al.</i> , 1996).
PCAT166	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>bfpT-cat</i> a partir de los nucleótidos -166 a +69 (Martínez-Laguna <i>et al.</i> , 1999).
pORF19	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>orf19-cat</i> a partir de los nucleótidos -175 a +166 (Este estudio).
pTIR394	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>tir-cat</i> a partir de los nucleótidos -394 a +138 (Este estudio).

**Tabla 3 continuación.**

**PLÁSMIDOS**

pTIR243	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>tir-cat</i> a partir de los nucleótidos -243 a +138 (Este estudio).
pTIR204	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>tir-cat</i> a partir de los nucleótidos -204 a +138 (Este estudio).
pTIR157	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>tir-cat</i> a partir de los nucleótidos -157 a +138 (Este estudio).
pTIR122	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>tir-cat</i> a partir de los nucleótidos -122 a +138 (Este estudio).
pTIR97	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>tir-cat</i> a partir de los nucleótidos -97 a +138 (Este estudio).
pTIR80	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>tir-cat</i> a partir de los nucleótidos -80 a +138 (Este estudio).
pTIR45	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>tir-cat</i> a partir de los nucleótidos -45 a +138 (Este estudio).
pTIR22	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>tir-cat</i> a partir de los nucleótidos -22 a +138 (Este estudio).
pTIREAE	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>tir-cat</i> a partir del nucleótido -294 de <i>tir</i> al cuarto codón de <i>eae</i> (Este estudio).
pTIR-EAE-DEL1	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>tir-cat</i> a partir del nucleótido -294 de <i>tir</i> al codón 15 de <i>cesT</i> (Este estudio).
pTIRCAM-10	Derivado de pTIR-EAE donde la secuencia -10 de <i>tir</i> fue reemplazada por el sitio de restricción de la enzima <i>SacI</i> (Este estudio).
pTIRCAM-10-DEL1	Derivado de pTIRCAM-10 donde la región intergénica entre <i>cesT-eae</i> fue removida (Este estudio).

### Tabla 3 continuación.

#### PLÁSMIDOS

- pCEST Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *cesT-cat* conteniendo la región intergénica entre *tir* y *cesT*, a partir del nucleótido +776 al +1920, con respecto al inicio de transcripción de *tir* (Este estudio).
- pEAE1800 Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *eae-cat*, que contiene 1800 pb corriente arriba del codón de inicio de *eae* (Este estudio).
- pEAE1629 Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *eae-cat* que contiene en el extremo 5' 1629 pares de bases corriente arriba del ATG de *eae* (Este estudio).
- pCEST-EXT-EAE Derivado de pCEST, donde se clonó un fragmento que contiene la región intergénica de *cesT* y *eae*, resultando equivalente al pEAE1629 (Este estudio).
- pEAE1422 Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *eae-cat* conteniendo en el extremo 5' 1422 pares de bases corriente arriba del ATG de *eae* (Este estudio).
- pEAE532 Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *eae-cat* conteniendo en el extremo 5' 532 pares de bases corriente arriba del ATG de *eae* (Este estudio).
- pbfp $\Delta$ TVW-cat Derivado del pWKS130 que contiene una fusión de *bfpW* a *cat*, incluye la región reguladora del operón *bfpTVW* y la remoción en fase de *bfpT*, *bfpV* completo y 12 codones de *bfpW* (Sosa, 1999).
- pWKS130 Vector de clonación de bajo número de copias ( $K_m^f$ ); contiene el origen de replicación pSC101 (Wang y Kushner, 1991).
- pBTA-BHI-3D Derivado de pWKS130 que contiene el operón *bfpTVW* (Tobe *et al.*, 1996)
- p $\Delta$ TVW2143 Derivado del pBTA-BHI-3D que lleva una remoción en fase del gen *bfpT* (Este estudio).

### Tabla 3 continuación.

#### PLÁSMIDOS

- pTΔVW2143 Derivado del pBTA-BHI-3D que lleva una remoción en fase del gen *bfpV* (Este estudio).
- pTΔV2W2143 Derivado del pBTA-BHI-3D que lleva una remoción en fase de *bfpV* (se removieron 19 codones más que en pTΔVW2143)(Este estudio).
- pTVΔW2143 Derivado del pBTA-BHI-3D que lleva una remoción en fase del gen *bfpW* (Este estudio).
- pTΔVΔW2143 Derivado del pBTA-BHI-3D que lleva una remoción en fase de los genes *bfpV* y *bfpW* (Este estudio).
- pTV<sub>C122</sub>1431 Derivado de pBTA-BHI-3D que contiene el gen *bfpT* completo y 122 codones del gen *bfpV*, clonados en pWKS130.
- pTV<sub>C31</sub>1159 Derivado de pBTA-BHI-3D que contiene el gen *bfpT* completo y 31 codones del gen *bfpV*, clonados en pWKS130.
- pBTA-BHI-18D Derivado del pBTA-BHI-3D que lleva el locus *bfpTVW* con el gen *bfpT* truncado en la región amino, careciendo de 47 codones y de la región reguladora del operón (Bustamante, 1998).
- pMPM-K3 Vector de clonación de bajo número de copias, que contiene el origen de replicación p15A (Km<sup>r</sup>) (Mayer, 1995).
- pCS-TVW Derivado de pMPM-K3 que contiene el operón *bfpTVW* (Este estudio).
- pCS-VW Derivado del pCS-TVW que lleva una remoción en fase del gen *bfpT* (Este estudio).
- pCS-TW Derivado del pCS-TVW que lleva una remoción en fase del gen *bfpV* (Este estudio).
- pCS-TW2 Derivado del pCS-TVW que lleva una remoción en fase del gen *bfpV* (se removieron 19 codones más en el extremo amino que en pCS-TW) (Este estudio).
- pCS-TV Derivado del pCS-TVW que lleva una remoción en fase del gen *bfpW* (Este estudio).

**Tabla 3 continuación.**

**PLÁSMIDOS**

pCS-T	Derivado del pCS-TVW que lleva una remoción en fase de los genes <i>bfpV</i> y <i>bfpW</i> (Este estudio).
pCS-TVW	Derivado del pCS-TVW que lleva el locus <i>bfpTVW</i> con el gen <i>bfpT</i> truncado en la región amino, careciendo de 47 codones, y de la región reguladora del operón. (Este estudio).

**Tabla 4**

**Oligonucleótidos utilizados en este estudio.**

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
RORF10-H3R	TGTTATCCCAAGCTTATGT
ORF19-H3R	CCGCCTAAGCTTACGCTCTAC
TIR-H3R	CTGTTTGTGAAGCTTGTGGC
EAE1669REG	GGGATAAAAAGCTTGAGTA
EAEREG06	GTTTCGCTCAGATCCTAAATTCTG
EAEREG1052L	CAACGTTGCAGCATGGGTAAC
ORFU-H3R	CCAACACCAATTTTTCCGC
CAM10TIR2R	ACCAGAGCTCTCACAGTATAATTTTTG
CAM10TIR1F	GTGAGAGCTCTGGTTTATGCTCAGTTTG
TIR22F-E23	CATCAAAAAGGATCCTGTGATTTATTTG
TIR45F-E23	CATTTCTGGATCCTTATTTTGC
TIR80F-E23	GATTTTGATTATGGGATCCTTTA
TIR97F-E23	GATAATTATAGGATCCTTTTGATTATG
TIR122F-E23	CATATAAAAATTAGGATCCTTTTTTTTC
TIR157F-E23	ATATTATTTTTGGATCCACAATTAATTTTC
TIR204F-E23	TTTTTTCTGGATCCAAAAGGTCTC
TIR243F-E23	GATACTCGGATCCAGGGGGAAC
UBFPT183	GGGCGGTGCCATATTACGAG
BFPT-DEL-5-1	CCTCAAGCTTATTTTCAGAACTCTGC
BFPV-DEL-5-3	GCTTTCCATCTAGAAGGTAATG

**Tabla 4 continuación.**  
**Oligonucleótidos utilizados en este estudio.**

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
BFPW-DEL-5-5	CTGCAGCTCGTCTAGAAAACCC
BFPV2-DEL-5-7	CTTCTCTAGAATTGTTCTTC
BFPT-DEL-3-2	GGCGTTTCATGAATTACACAAGGAAC
BFPV-DEL-3-4	GATATTCTTTCTAGATCAAAAAGAGC
BFPW-DEL-3-6	TAAAGCATCTAGAAAAATGGGGCTTG
H2F3060	AGGTGTAATTGCTTTCCA
H2F2787	AAGAATATCACCGCCTCC
16S	CACAGATTGTCTGATAAATTG
M13FAVOR	GGGTTTTCCCAGTCACGACG
M13CONTRA	CGGATAACAATTTACACAG

**Condiciones de crecimiento.**

Las cepas bacterianas se cultivaron de manera rutinaria en medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) a 37°C. Para cultivos a 37°C o a diferentes temperaturas se utilizó el medio DME (Dulbecco's modified Eagle's) que contiene 0.45 % (w/v) de glucosa y L-glutamina (584 mg/l), sin piruvato de sodio (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, N. Y., EUA), y que se suplementó con 1% de LB y piridoxal (4µg/ml) (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, N. Y., EUA). Para evaluar el efecto del amonio se agregó sulfato de amonio (20mM), donde se indica. Las diferentes cepas se cultivaron durante toda la noche en LB a 37°C y 110 r.p.m. Las bacterias se concentraron mediante centrifugación y la pastilla obtenida se resuspendió en solución salina de fosfatos al 1% (PBS, phosphate-buffered saline) pH 7.4, a una densidad óptica de 1 (D.O.<sub>600nm</sub>). Esta suspensión se diluyó 1:50 en 50 ml de LB o DME 0.45% y se incubó en un baño con agitación a 200 r.p.m. (Gyroma 902; Amerex Instruments, Inc., Lafayette, C.A., EUA) a las temperaturas indicadas en cada



caso. Cuando fue necesario, se adicionaron los siguientes antibióticos: ampicilina (100µg/ml), ácido nalidíxico (15µg/ml), kanamicina (40µg/ml), cloramfenicol (50µg/ml), gentamicina (15µg/ml) y tetraciclina (25µg/ml) (Sigma Chemical Co., ST Louis, MO). Las muestras para determinar actividad de CAT y para extracción de RNA se colectaron a las densidades ópticas de 0.8, 1.0, 1.2, y 1.4 (D.O.<sub>600nm</sub>). En los experimentos para medir los efectos de la fase de crecimiento, las muestras se tomaron cada hora a lo largo del cultivo.

### **Técnicas de Biología Molecular.**

La manipulación de DNA se desarrolló con protocolos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989). Las enzimas de restricción y de modificación del DNA se obtuvieron de Boehringer Mannheim (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) o Gibco BRL (Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y.) y se usaron de acuerdo a las instrucciones de los proveedores. El DNA plasmídico fue obtenido utilizando un estuche de reactivos Qiagen (Qiagen Inc., Chatsworth, CA).

Los nucleótidos marcados radioactivamente (-<sup>32</sup>P)-dCTP (3000 Ci mmol<sup>-1</sup>) se obtuvieron de Amersham (Amersham LIFE SCIENCE Inc. Cleveland, Ohio). Los oligonucleótidos utilizados (Tabla 4) se adquirieron de BioSynthesis (BioSynthesis Inc., Lewisville, TX) o en la unidad de síntesis de oligonucleótidos del IBt/UNAM. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 100µl o 50µl usando la polimerasa AmpliTaq-gold (Perkin-Elmer Corp., Branchburg, New Jersey) de acuerdo con las instrucciones de los proveedores. La secuenciación del DNA de los plásmidos generados en este trabajo se realizó por el procedimiento de terminación de la cadena con dideoxinucleótidos (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989) usando un estuche de reactivos para secuenciación con Thermosecuense (Amersham LIFE SCIENCE Inc. Cleveland, Ohio) siguiendo instrucciones de los proveedores.

### **Construcción de las fusiones transcripcionales.**

Para monitorear la expresión de los genes *orf19*, *tir*, *cesT* y *eae*, se construyó una serie de fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* (Fig. 1 y 5, anexo 1). Para esto, se amplificaron fragmentos de PCR de diferentes extensiones, que abarcan la región entre *orf19* y *eae*, y se utilizó como molde DNA cromosomal de la cepa de EPEC E2348/69. Los oligonucleótidos se diseñaron para introducir sitios de restricción reconocidos por las enzimas *Bam*HI o *Hind*III (Tabla 4). Los fragmentos de PCR amplificados se digirieron con *Bam*HI y *Hind*III y clonaron en el plásmido pKK232-8 digerido con las mismas enzimas. Los plásmidos resultantes (Tabla 3) se secuenciaron para confirmar la fidelidad de las amplificaciones por PCR, e introducidos a diferentes cepas por electroporación, utilizando un aparato electroporador (Gene Pulser apparatus, BioRad) a 1.8 kV, 25 $\mu$ F, y 200 $\Omega$ , o por transformación por CaCl<sub>2</sub> de acuerdo a protocolos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989).

### **Construcción de plásmidos que contienen genes del locus *bfpTVW*.**

Los plásmidos p $\Delta$ TVW2143, pT $\Delta$ VW2143, pTV $\Delta$ W2143, pT $\Delta$ V2W2143, p $\Delta$ TVW2143, pT $\Delta$ V $\Delta$ W2143, pTV<sub>C122</sub>1431 y pTV<sub>C31</sub>1159 (Fig. 7) se construyeron mediante la clonación de fragmentos obtenidos a partir del plásmido pTBA-BHI-3D, en el vector pWKS130. Los fragmentos se obtuvieron por PCR utilizando oligonucleótidos complementarios al vector y a los genes del locus *bfpTVW* (Fig. 7 y Tabla 4); los oligonucleótidos complementarios al locus regulador generan el sitio de restricción *Xba*I. En cada plásmido se señala con el símbolo  $\Delta$  el gen que se removió del operón. Los plásmidos pCS-TVW, pCS-VW, pCS-TW, pCS-TW2, pCS-TV, pCS-T, pCS-T'VW se obtuvieron subclonando los insertos de los plásmidos de la serie en pWKS130, mencionados arriba, en el vector pMPM-K3, aprovechando los sitios *Bam*HI y *Sac*I.

### **Aislamiento de RNA y análisis de extensión inversa o "Primer extension".**

Se obtuvo RNA total de bacterias cultivadas en DME o LB utilizando los estuches comerciales "Rneasy Qiagen" (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) o "Boehringer Mannheim High pure RNA isolation kit" (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany). Se determinó la calidad y concentración del RNA con lecturas a D.O.<sub>260nm</sub> y D.O.<sub>280nm</sub>. Para las reacciones de extensión inversa o "Primer extension" (PE) los oligonucleótidos complementarios al extremo 5' de los genes estructurales *tir*, *cesT*, *ea*e u *orf19* se marcaron radioactivamente con [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-dATP utilizando la enzima polinucleótido cinasa T4. Los oligonucleótidos se alinearon con 5 ó 30µg de RNA total, por desnaturalización a 93°C por 3 minutos seguido por un enfriamiento lento hasta llegar a los 42°C de temperatura. Las reacciones de extensión de los diferentes oligonucleótidos se realizaron con 10 U de la enzima Transcriptasa reversa (RT) del virus de la mieloblastosis aviaria (AMV) (Amersham LIFE SCIENCE Inc. Cleveland, Ohio), a 45°C por 1 hr. en una solución amortiguadora con dithiothreitol (DTT) 1mM, dNTPs 0.27 mM por cada uno, y 50 U de inhibidor de Rnsa (Amersham LIFE SCIENCE Inc. Cleveland, Ohio). Los productos obtenidos se purificaron mediante columnas concentradoras Microcon-10® (Amicon, Inc., Beverly, MA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida 8%, Urea 7M y solución amortiguadora de boratos (TBE) como se ha descrito previamente (Bustamante *et al.*, 1998; Martínez-Laguna *et al.*, 1999). Como un control de la calidad y concentración de RNA utilizado, se realizó una reacción de PE utilizando un oligonucleótido específico para rRNA 16S (Tabla 4). Paralelamente, se realizaron reacciones para determinar la secuencia de las regiones analizadas, utilizando los mismos oligonucleótidos y DNA de los diferentes plásmidos derivados del pKK232-8 los cuales llevan fragmentos que comprenden los genes y regiones reguladoras estudiados en este trabajo.

### **Ensayos de hibridación en canal (“Slot-blot”).**

El RNA total se extrajo de muestras tomadas de cultivos de bacterias crecidas en medio DME a 37°C a una D.O.<sub>600</sub> de 0.8, usando el estuche “Rneasy Qiagen” (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) de acuerdo a las instrucciones del productor. EL RNA (5, 10 ó 20µg) se desnaturalizó y se transfirió a una membrana de nylon (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) utilizando un aparato para “slot-blot” PR600 (Hoefer Scientific Instruments). Las membranas se incubaron por 3 hrs. a 42°C en una solución de prehibridación conteniendo 20% formamida, 6x SSC, 2x de solución Denhardt’s y 200µg ml<sup>-1</sup> de DNA de esperma de salmón. La hibridación se realizó por 14 hrs. a 42°C en solución fresca conteniendo una sonda específica, la cual se marcó radioactivamente con [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-dATP, utilizando un sistema de marcaje de DNA “multiprime” (Amersham LIFE SCIENCE Inc. Cleveland, Ohio). Las membranas se lavaron dos veces con 2 x SSC/0.1% SDS y dos veces con 0.2 x SSC/0.1% SDS por 15 minutos a 42°C, y se secaron y se expusieron a una película de rayos X. Las sondas utilizadas corresponden las regiones codificantes de los genes *bfpT*, *tir* y al RNA ribosomal 16S, según se indica en cada caso. Las sondas se obtuvieron por medio de PCR o por purificación a partir de geles de agarosa de fragmentos obtenidos por tratamiento con enzimas de restricción.

### **RT-PCR.**

Para confirmar la organización transcripcional de los genes *tir*, *cesT* y *eae* se realizaron ensayos de RT-PCR. Para esto, 3.5 µg de RNA total de la cepa EPEC E2348/69, cultivada en medio DME a una D.O.<sub>600</sub> de 0.8, se trató con 30 U de DNAsa (Amersham LIFE SCIENCE Inc. Cleveland, Ohio), después se obtuvo el cDNA complementario, correspondiente a los transcritos de *tir*, *cesT* y *eae*, utilizando 9 U de Transcriptasa reversa AMV-RT (Amersham LIFE SCIENCE Inc. Cleveland, Ohio), como se describe anteriormente, pero sin marcar radioactivamente los oligonucleótidos. El cDNA resultante se usó como templado para amplificar, por PCR, las diferente regiones intergénicas utilizando combinaciones de los oligonucleótidos EAEREG06, EAEREG1052L, ORFU-H3R y EAE1669REG (Tabla 4). Para detectar contaminación con DNA reacciones

similares pero sin Transcriptasa reversa, se incluyeron como controles. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. DNA del fago  $\lambda$  digerido con la enzima *Sfi*I fue utilizado como marcador de peso molecular.

#### **Actividad de la acetil transferasa del cloramfenicol (CAT).**

El ensayo para determinar la actividad de la enzima acetil transferasa del cloramfenicol (CAT) se realizó como se describió previamente (Puente *et al.*, 1996; Bustamante *et al.*, 1998). Las muestras se colectaron cada hora o cuando los cultivos alcanzaron D.O.<sub>600</sub>, de 0.8, 1.0, 1.2 y 1.4. Las muestras se centrifugaron (16, 000 x g) y lavaron con 1ml de una solución amortiguadora TDTT (Tris-HCl 50mM, pH 7.8 y de dithiothreitol 30mM). La pastilla se resuspendió en 500 $\mu$ M de TDTT más 0.1% de Tritón X-100 e incubó con agitación a 37°C por 1 hora para permitir la lisis celular. La suspensión se centrifugó (16, 000 x g) por 15 minutos a 4°C para separar restos celulares y células intactas, y los sobrenadantes se transfirieron a un tubo limpio. Para medir la actividad CAT 5  $\mu$ l de cada extracto se colocaron por duplicado en una placa de 96 pozos, y se adicionaron 200 $\mu$ l de la mezcla de reacción con: 1mM de DNTB 5,5'-dithio-bis(ácido 2-nitrobenzoico) (Boehringer Mannheim)/ 0.1mM de acetyl-CoA (Pharmacia Biotech)/ 0.1mM de cloramfenicol (Sigma Chemical Co., ST Louis, MO) en 0.1M de Tris-HCl, a pH 7.8. Los cambios en la absorbancia a 410nm se leyeron y registraron cada 5 segundos durante 5 minutos, utilizando un lector automático para microplacas CERES 900 C y el "software" KC3 (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT) posicionado en modo de cinética. Las actividades se obtuvieron por extrapolación con una curva estándar de actividad de la enzima CAT purificada (Sigma Chemical Co., ST Louis, MO), que abarca concentraciones de 0 a 2500 U ml<sup>-1</sup>. La concentración de proteínas de los extractos celulares se determinó con un estuche para detección de proteínas (Pierce, Rockford, IL). Estos valores se utilizaron para calcular la actividad específica de CAT. Cada valor de actividad representa el promedio de al menos tres experimentos realizados de manera independiente.

## **RESULTADOS**

Los resultados de este estudio han sido divididos en dos capítulos.

**Capítulo I.** Regulación del operón *tir-cesT-eae* (LEE5) y del gen *orf19* de EPEC.

- Objetivos
- Resultados y discusión.
- Conclusiones
- Perspectivas

**Capítulo II.** El operón *bfpTVW* de EPEC.

- Objetivos
- Resultados
- Discusión
- Conclusiones
- Perspectivas

## **CAPÍTULO I**

**Regulación del operón *tir-cesT-eae* (LEE5) y del gen *orf19* de EPEC.**



## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los mecanismos que regulan la expresión de los factores de virulencia de EPEC.

## **OBJETIVO PARTICULAR**

Estudiar la expresión de los genes *orf19*, *tir*, *cesT* y *eae* de EPEC localizados en la isla de patogenicidad LEE.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Definir la organización transcripcional de los genes *orf19*, *tir*, *cesT* y *eae*, así como los inicios de transcripción de los mismos.
- Evaluar el papel de la proteína reguladora Ler, y de los productos del locus *bfpTVW* en la regulación de los genes *orf19*, *tir*, *cesT* y *eae*.
- Evaluar el efecto de condiciones ambientales que estimulan la expresión de factores de virulencia de EPEC, sobre la expresión de los genes *orf19*, *tir*, *cesT* y *eae*.
- Determinar los elementos en *cis* necesarios para la expresión y regulación de los genes, *tir*, *cesT* y *eae*.

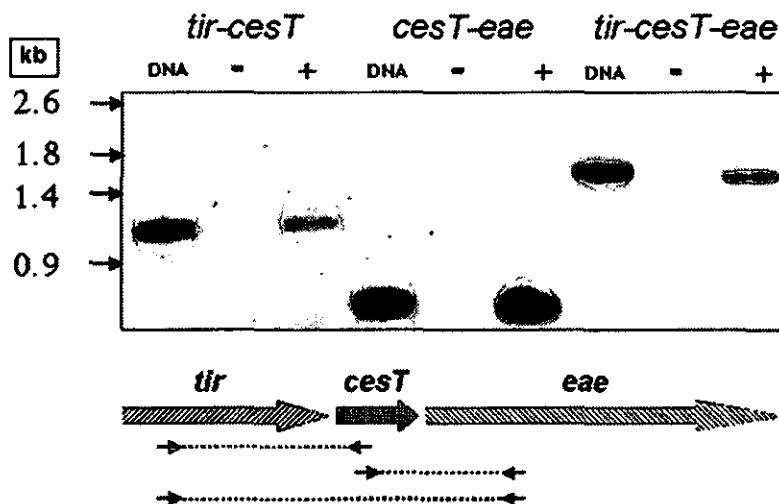
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante el uso de fusiones transcripcionales y ensayos de RT-PCR se definió que los genes *tir*, *cesT* y *eae* conforman un operón, que se denominó LEE5, y el gen *orf19* es una unidad transcripcional monocistrónica independiente (Fig. 1, anexo 1 y Fig. 3 ).

El inicio de transcripción del operón *tir*, correspondiente a una T, se localizó 85 pares de bases corriente arriba del codón de inicio de la traducción de *tir* (Fig. 2A y 3A, anexo 1). Al examinar las región 5' se localizaron las posibles regiones promotoras -35 (TTGCAT) y -10 (TTTATT) (Fig. 3A, anexo 1). El cambio de región -10 por la secuencia CTCGAG generó fusiones inactivas, corroborando la importancia de esta región en la transcripción del operón LEE5 (Fig. 1, anexo 1). También se localizó un segundo sitio de inicio de la transcripción, correspondiente a un residuo T, 24 pb corriente arriba del primer sitio mencionado (Fig. 2A, anexo 1). La relevancia de este promotor aún no se ha definido.

Se localizó un sitio de inicio de la transcripción para *orf19* en un residuo de A, localizado 133 pb corriente arriba de su codón de inicio de la traducción (Fig. 2B y 3B, anexo 1). Con el análisis de la secuencia de la región 5' se localizaron las posibles secuencias promotoras -35 y -10 (TTGCAT y ATAAAT, respectivamente) (Fig. 3B, anexo 1).

Interesantemente, el uso de fusiones transcripcionales indicó la posible existencia de un promotor adicional corriente arriba de *cesT*. Los ensayos de PE mostraron dos inicios de transcripción a partir del transcrito de la fusión pCEST (Fig. 2C y 3C, anexo 1), pero ninguno utilizando RNA total de la cepa silvestre (datos no mostrados). Es probable que la expresión del promotor cromosómico sea muy baja y las técnicas utilizadas no hayan sido lo suficientemente sensibles para detectarla. Sin embargo, no podemos descartar que este promotor sea activo en alguna condición no probada en este estudio. Además, una fusión que contiene además del gen *cesT* completo, la región intergénica entre *cesT* y *eae*, así como los primeros codones de *eae* (pCEST-EXT



**Fig. 3. Los genes *tir*, *cesT* y *eae* forman un operón.**

Ensayo de RT-PCR para analizar la organización transcripcional de los genes *tir*, *cesT* y *eae*. Se obtuvo RNA total de la cepa de EPEC E2348/69 creciendo en medio DME a una densidad óptica de 0.8, el cual fue utilizado como templado para RT-PCR (+), como se describe en materiales y métodos. Como control del tamaño de los fragmentos esperados se realizaron reacciones de PCR a partir de DNA cromosomal de la misma cepa de EPEC (C). Como control negativo, se realizaron reacciones en ausencia de la enzima transcriptasa reversa (-). Las regiones incluidas en cada reacción de extensión son indicadas arriba de cada carril. Los oligonucleótidos utilizados fueron: para *tir-cesT*, EAEREG06/ORFU-H3R; para *cesT-eae*, EAEREG1052/EAEREG1669R; y para *tir-cesT-eae*, EAEREG06/EAEREG1669R (Tabla 4).

equivalente a pEAE1629, tabla 3), no presentó actividad CAT (Fig. 1, anexo 1). Lo anterior sugirió que la transcripción iniciada corriente arriba de del gen *cesT* termina específicamente al final de *cesT* y que la transcripción del gen *eae* depende exclusivamente del promotor de *tir*.

La función de las proteínas Tir, CesT e intimina explica la importancia de que se encuentren codificadas en un operón y su expresión esté coordinada. La presencia de un promotor con baja expresión localizado entre *tir* y *cesT* sugiere que una pequeña cantidad de la chaperona CesT es necesaria antes de que Tir sea producida. Aun cuando es necesario desarrollar trabajo adicional para confirmar la funcionalidad *in vivo* y relevancia de dicho promotor, es importante mencionar que un reporte publicado recientemente propone también la existencia de un promotor entre los genes *tir* y *cesT* (Elliott *et al.*, 1999). Este promotor no coincidió con los dos inicios reportados en este trabajo, indicando que la señal que se obtiene en el extremo 5' del mensajero puede ser variable, y esto puede ser debido al procesamiento del mismo.

Un reporte previo indicó la existencia de un inicio de transcripción para el gen *eae* (Gómez-Duarte y Kaper, 1995); sin embargo, fusiones que contienen la región corriente arriba del gen *eae* no presentaron ninguna actividad y experimentos de PE con RNA obtenido de bacterias crecidas en diferentes condiciones dieron resultados negativos. Lo anterior indicó que este gen, bajo las condiciones probadas, sólo es expresado a partir del promotor del operón localizado corriente arriba de *tir*.

El análisis de los elementos necesarios para la expresión del operón *LEE5* y del gen *orf19* indicó que el producto del gen *ler* es necesario para la activación de la transcripción (Figs. 2, 4 y 7, anexo 1). Ler presenta homología con la proteína reguladora H-NS, la cual es una proteína asociada al nucleóide de manera no específica que se une a regiones ricas en AT y que presentan doblamientos (Owen-Hughes *et al.*, 1992; Lucht *et al.*, 1994; Tupper *et al.*, 1994; Zuber *et al.*, 1994). H-NS modula, principalmente, de manera negativa la expresión de genes involucrados en diferentes procesos celulares, incluyendo virulencia (revisado por Atlung e Ingmer, 1997).

El análisis de la región promotora del operón *LEE5* indicó que su regulación involucra elementos que actúan en *cis* y en *trans*. En ausencia de Ler el operón *LEE5* no se expresa; sin embargo, si se remueve la región corriente arriba de *tir* entre las posiciones -97 y -157, el operón puede expresarse aún en ausencia de Ler. Lo anterior indica que Ler estaría actuando, probablemente uniéndose, entre las posiciones -157 y la -204, como una proteína que contrarresta la represión ejercida por algún represor (Fig. 6, ver más adelante).

El análisis de la expresión de *tir* en cepas de *E. coli* mutantes en diferentes reguladores globales, indicó que proteínas como IHF, RpoN, RpoS, Fis, Lrp, CRP, Fur y H-NS no están involucradas en la regulación negativa de *tir*. Por su parte, este análisis reveló que H-NS reprime la expresión de *orf19* (Tabla 5). Es importante remarcar que el represor de *tir* se encuentra conservado entre *E. coli* K12 y EPEC, pues en *E. coli* K12 también se observó represión (Fig. 5, anexo 1). H-NS se ha involucrado en mecanismos de regulación negativa de los genes *bgl* y *proU* en *E. coli* y de factores de virulencia como *virB* de *Shigella flexneri* (Tobe *et al.*, 1993; Tupper *et al.*, 1994; Caramel y Schnetz, 1998). Por otro lado, no podemos descartar que la represión de *tir* esté determinada por varias proteínas como sucede en la regulación del gen *osmY*, el cual se reprime por CRP, Lrp e IHF (Colland *et al.*, 2000).

La región en el promotor de *tir* involucrada con el control negativo, entre las posiciones -157 y -122, contiene trechos ricos en A y en T que son característicos de promotores regulados por H-NS; sin embargo, esta proteína parece no encargarse de la represión de dicho promotor. La proteína StpA, la cual presenta homología con H-NS, también se asocia con la regulación, y en algunos casos podría interactuar con H-NS (Dorman *et al.*, 1999); sin embargo, la mutación del gen *stpA* tampoco tuvo un efecto en la expresión del operón *LEE5* (Tabla 5). En la región promotora de *orf19* también se localizan trechos de A y T que pueden estar involucrados en la regulación por H-NS. Por otro lado, los operones *LEE2* y *LEE3*, que codifican para el sistema de secreción, también se reprimen por la proteína H-NS (Bustamante *et al.*, 2001) y, al igual que el gen *orf19* y el operón *LEE5*, requieren de la proteína Ler para su des-represión.

**Tabla 5**  
**Efecto de mutaciones en reguladores globales de *E. coli* sobre la expresión del operón *LEE5* y del gen *orf19*.**  
**H-NS regula negativamente *orf19*, pero no la de *tir*.**

CEPAS <sup>b</sup>	Plásmidos		
	pTIR394/ pTIR157	pTIR80 <sup>c</sup>	pORF19
EPEC wt	334±43 <sup>a</sup>	480±63	63±11
CSH56 wt	<20	436±56	<20
CSH56 ΔH-NS	<20	389±45	470±36
ΔLRP	<20	456±78	<20
N99 wt	<20	367±78	<20
ΔIHF	<20	438±45	<20
MC4100 wt	<20	343±14	<20
ΔrpoS	<20	600±30	<20
Δfis	<20	391±27	<20
ET800 wt	<20	603±11	<20
ΔrpoN	<20	710±94	<20
3110 wt	<20	691±10	<20
ΔCRP	<20	668±8	<20
Δcya	<20	559±17	<20
ΔompB	<20	707±32	<20
dam <sup>-</sup>	<20	248±10	<20
ΔstpA	<20	583±39	<20

a) La actividad específica de CAT esta expresada en  $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$  y fue determinada de muestras tomadas de cada cepa cultivadas en medio LB a 37°C a D.O.<sub>600nm</sub> de 1.4. Los resultados son el promedio de al menos tres experimentos diferentes.

b) El genotipo de cada cepa es descrito en la Tabla 2.

c) Como control positivo se incluyó la fusión pTIR80 cuya expresión no depende de la proteína reguladora Ler, ya que no contiene los elementos en la secuencia requeridos para la represión, pero aún es regulada en LB.

Cuando se hace un análisis de la secuencia de los promotores de los genes de LEE, regulados por Ler y por H-NS, no se observan secuencias que puedan establecer un consenso de sus sitios de unión. Un análisis detallado de la región promotora de *orf19* se está realizando para determinar los elementos *in cis* involucrados en regulación de este gen.

Como se ha visto, existen distintos elementos represores para los operones del LEE, lo cual sugiere que su expresión está regulada espacial y temporalmente. De esta manera, se abre una serie de preguntas entre las que resaltan el ¿por qué utilizar otra proteína represora para el operón *LEE5*? ¿utiliza Ler diferentes mecanismos para liberar la represión?

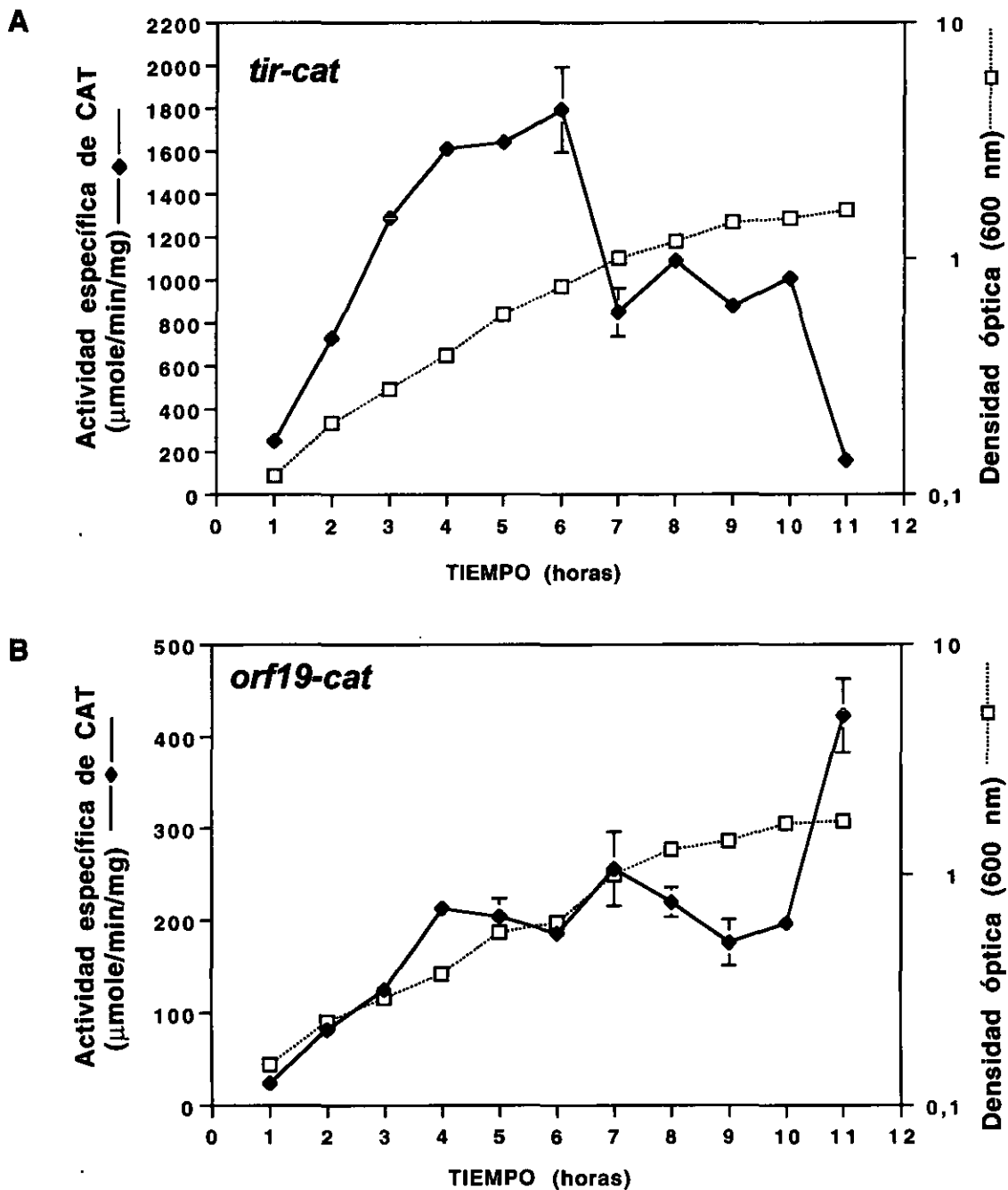
Reportes anteriores indicaron que el locus *bfpTVW* era necesario para la expresión de los genes localizados en la región LEE (Gómez-Duarte y Kaper, 1995; Knutton *et al.*, 1997; Mellies *et al.*, 1999). Específicamente el gen *perC* o *bfpW* activó la expresión de *eae* (Gómez-Duarte y Kaper, 1995). Sin embargo, en contraste con lo reportado, la ausencia del plásmido pEAF, y por tanto del locus *bfpTVW*, no tuvo un efecto en la expresión del operón *LEE5* o del gen *orf19* (figura 2, anexo 1). De esta manera demostramos que el plásmido pEAF no se requiere para la expresión de dichos genes. Es importante mencionar que cuando se analizó la expresión de *LEE5* en una cepa que tiene mutado el locus *bfpTVW*, se observó que no había diferencias con una cepa donde el operón *bfpTVW* está completo (datos no mostrados). Resultados obtenidos en el laboratorio han indicado que la misma mutación en *bfpT* sí tiene un efecto sobre la expresión de los operones *LEE2* y *LEE3* (sistema de secreción tipo III). Estos resultados también indicaron que el gen *bfpW* es esencial para la expresión de estos operones sólo cuando está el resto del plásmido pEAF. Lo anterior sugirió que el locus *bfpTVW* podría tener un papel en la regulación de estos operones, y que el producto de *bfpW* antagoniza a un factor codificado en el pEAF que regula negativamente.

Trabajos recientes indican que la expresión del gen *ler* requiere de IHF (Friedberg *et al.*, 1999) y el producto del gen *bfpW* puede aumentar la expresión de *ler* en fase estacionaria (Pérez, 2001). La diferencia en expresión de *ler* con o

sin *bfpW* no afecta la expresión del operón *LEE5* (Fig. 2, anexo 1 y datos no mostrados), lo cual sugiere que mientras existan niveles constitutivos o basales de Ler el promotor de *tir* puede expresarse; en contraste, la expresión de *LEE2*, *LEE3*, y probablemente *orf19*, requeriría niveles mayores de Ler. Lo anterior también sugiere que podrían existir diferencias en la afinidad de Ler por los diferentes promotores. Otra opción es que la diferencia esté dada por la afinidad variable de los distintos represores, H-NS en el caso de *LEE2*, *LEE3* y *orf19*, y el de *tir*, aún no conocido. Por otro lado, es probable que Ler este regulando la expresión de otros genes de virulencia en fase estacionaria; donde aumenta la expresión del gen *ler* por el producto del gen *bfpW*. Finalmente, la expresión del operón *LEE5* y del gen *orf19* a lo largo de la curva de crecimiento, en cepas de EPEC silvestre y carentes del pEAF, así como en una cepa de EHEC, no mostró cambios en su patrón, reforzando el hecho de que la variación en los niveles de expresión de Ler, mediada por *bfpW*, no tiene un efecto sobre la expresión de dichos genes.

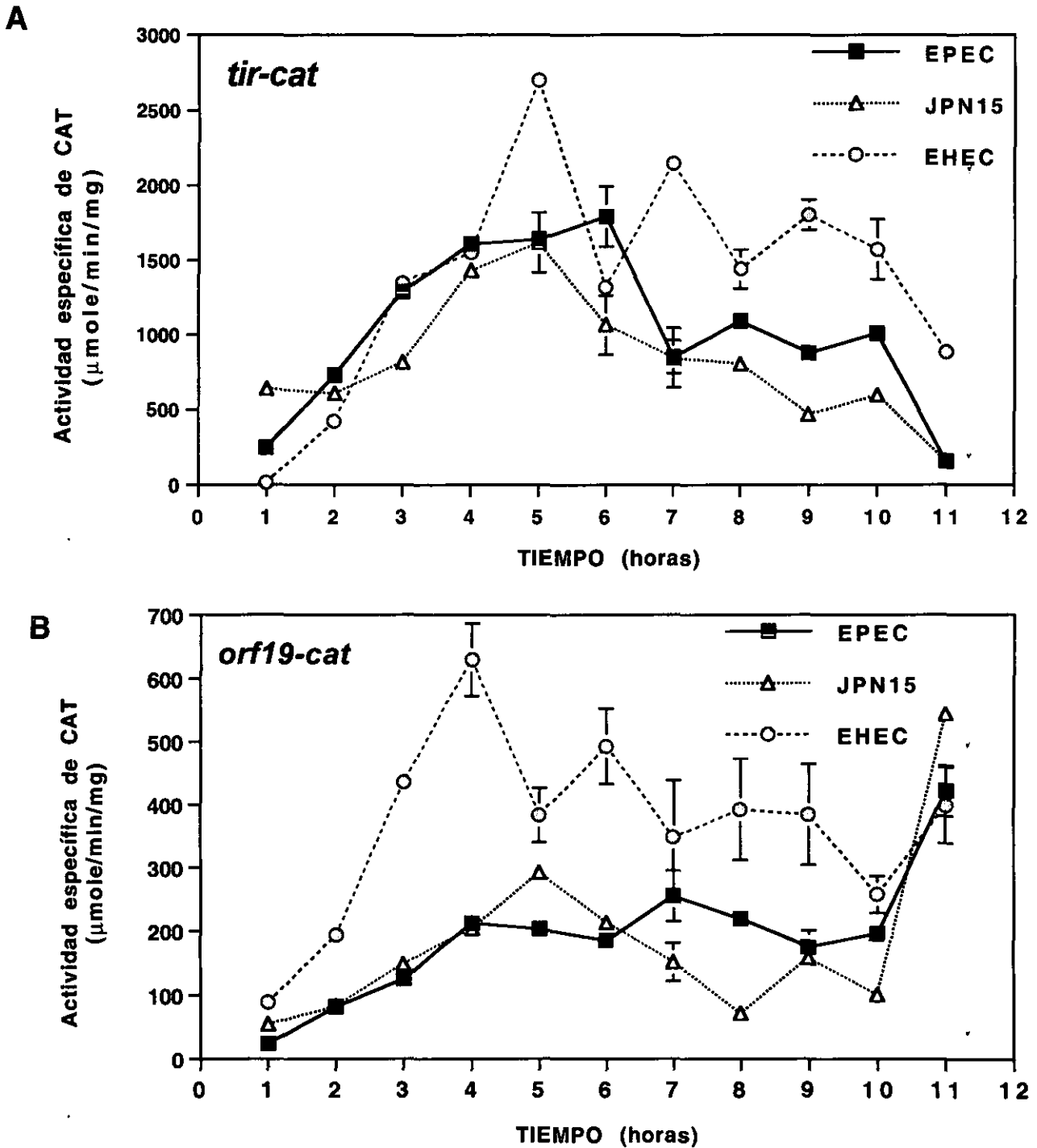
Los diferentes genes de virulencia de bacterias como *Vibrio cholerae*, *Shigella*, *Yersinia* y *Escherichia coli* patógenas son regulados por condiciones ambientales (Maurelli, 1989; Skorupski y Taylor, 1997; Harel y Martin, 1999; DiRita *et al.*, 2000). Específicamente, varios de los genes de virulencia de EPEC se regulan por fase de crecimiento, temperatura, medio de cultivo y amonio, condiciones que mimetizan el ambiente en el que esta bacteria se desarrolla. La expresión de *bfpA* es máxima al final de la fase exponencial de crecimiento y se reduce en la fase estacionaria (Puente *et al.*, 1996). Por otro lado, la expresión de *bfpT* ocurre a través de toda la curva de crecimiento (Martínez-Laguna *et al.*, 1999). Para evaluar el efecto de la fase de crecimiento sobre la expresión del operón *LEE5* y del gen *orf19*, se analizó la expresión de las fusiones *tir-cat* y *orf19-cat* creciendo las cepas E2348/69/pTIR393, JPN15/pTIR393, E2348/69/pORF19 y JPN15/pORF19 en DME a 37°C (Figs 4 y 5).





**Fig. 4. Efecto de la fase de crecimiento en la expresión del operón *LEE5* y *orf19*.**

La expresión de *LEE5* y *orf19* ocurre durante la fase de crecimiento exponencial temprana. El efecto de la fase de crecimiento sobre la expresión de las fusiones transcripcionales *tir-cat* (A) y *orf19-cat* (B) fue analizado midiendo la actividad de CAT (rombos negros) en muestras de cultivo tomadas cada hora de las cepas E2348/69/pTIR394 y E2348/69/pORF19, creciendo en medio DME a 37°C. La curva de crecimiento se generó midiendo la densidad óptica a 600nm de muestras de los cultivos tomadas cada hora (cuadrados blancos).



**Fig. 5.** El plásmido EAF no se requiere para la expresión de *LEE5* y de *orf19*. El papel del pEAF en la expresión de las fusiones *tir-cat* (A) y *orf19-cat* (B) a lo largo de la curva de crecimiento de EPEC, se analizó midiendo la actividad de CAT de ambas fusiones en EPEC E2348/69 (silvestre) (cuadros negros), EPEC JPN15 (pEAF-) (triángulos blancos) y EHEC EDL933, la cual contiene la región LEE pero carece del plásmido pEAF (círculos grises).

La fase de crecimiento se determinó por mediciones de la densidad del cultivo a  $DO_{600}$  y se registró la actividad específica de CAT en muestras recolectadas cada hora. El crecimiento de las cuatro cepas fue similar (datos no mostrados).

El operón *LEE5* y el gen *orf19* se expresan en la parte inicial de la fase logarítmica del crecimiento, y hay una disminución tanto al final de esta fase como durante parte de la fase estacionaria (Fig. 4). En el caso del gen *orf19* se observó una segunda fase de activación durante la fase estacionaria tardía (Fig. 4B). Lo anterior, fue similar tanto en la cepa silvestre de EPEC, como en la cepa JPN15, que carece del plásmido pEAF, indicando que éste no está involucrado en esta regulación (Figura 5A). Varios genes regulados por fase de crecimiento se reprimen o activan en la fase estacionaria por reguladores cuyos genes son activados por el factor sigma RpoS (Loewen y Hengge-Aronis, 1994; Edwards *et al.*, 2000); sin embargo, su papel en la represión del operón *LEE5* en fase estacionaria o durante la segunda fase de activación de *orf19*, aún no se ha evaluado en EPEC.

Por otro lado, la expresión máxima del gen *orf19* y el operón *LEE5* se observó cuando las bacterias se cultivaron en DME a 37°C. Dicha expresión se reprimió por crecimiento en medio de cultivo rico LB, en medio DME a temperaturas de 25°C y 40°C, y por medio DME más 20mM de amonio (Figs. 5 y 6, anexo 1). Ambos genes se regulan tanto en una cepa de EPEC silvestre, como en la cepa JPN15 curada del plásmido pEAF, indicando que el plásmido no codifica factores necesarios para que se lleve a cabo dicha regulación (datos no mostrados). La represión en medio de cultivo rico y a temperaturas por debajo de 37°C se observó aún para fusiones que contienen únicamente el promotor de *tir*. Por su parte la represión por temperaturas arriba de 37°C y por la presencia de amonio en el medio requirió de elementos de DNA específicos, presentes corriente arriba de las regiones -35 y -10.

La región comprendida entre las posiciones -157 y -122 fue necesaria para la represión por temperaturas altas. La región involucrada con regulación por amonio (entre -204 y -157) coincidió con aquella necesaria para la regulación por Ler (Fig. 3, anexo 1). Datos recientes generados en el laboratorio, indican que la expresión del gen *ler* se regula también por amonio, lo que indica que la regulación ejercida por este factor ambiental sobre la expresión del operón *LEE5*, puede ser un efecto de la regulación ejercida sobre *ler*. Lo anterior indicó que la expresión del operón *LEE5* y del gen *orf19* está sujeta a diferentes niveles de regulación negativa que, probablemente, involucran uno o más elementos, que, dependiendo de las condiciones de expresión, actúan sobre diferentes segmentos de la región reguladora de *tir*.

La regulación de estos genes en respuesta a señales en el ambiente coincide con lo observado para otros genes del LEE y, en general, para los factores de virulencia estudiados en EPEC. En el caso de otros genes de EPEC, la regulación por el amonio, temperaturas altas y medio de cultivo requiere de elementos específicos de EPEC, ya que en una cepa de *E. coli* K12 no se observa la represión mediada por estas condiciones de crecimiento (Martínez-Laguna *et al.*, 1999 y datos de la Parte III). Se ha propuesto que tales señales en el ambiente podrían determinar el sitio de colonización de EPEC en el intestino.

La regulación por temperatura es una característica común de varios genes de virulencia, el paso de un ambiente de baja temperatura al ambiente corporal, correlaciona con cambios drásticos en la expresión de los determinantes de virulencia de varios organismos (Maurelli, 1989; Mekalanos, 1992). Aunque se conocen varios ejemplos de regulación de factores de virulencia por temperatura, el mecanismo de termoregulación no se ha definido con claridad. La proteína H-NS se ha involucrado en varios casos de regulación por temperaturas bajas (Maurelli, 1989; Jordi *et al.*, 1992; Tobe *et al.*, 1993; Falconi *et al.*, 1998). Observaciones recientes indicaron que H-NS se necesita para la represión del gen *bfpA* por crecimiento a 25°C (Ibarra, 2001, datos no

publicados). Es probable que H-NS tenga un papel en la regulación del gen *orf19* y el operón *LEE5* a 25°C.

La presencia de amonio podría semejar lo que ocurre *in vivo* ya que su concentración varía a lo largo del tracto gastrointestinal. En el intestino delgado proximal tiene niveles bajos de amonio, mientras que en el intestino delgado distal y en el colón se presentan niveles más altos de amonio como resultado de su secreción producto del metabolismo de la microflora que habita abundantemente esta región (Toskes, 1993). EPEC coloniza principalmente la región proximal del intestino delgado, es decir, la que presenta niveles bajos de amonio. El amonio y las temperaturas altas no son señales de regulación comunes de los factores de virulencia en bacterias; sin embargo, ambas situaciones pueden encontrarse en algún sitio en el intestino o en el medio externo y pueden representar señales que indican a la bacteria peligro o nichos inapropiados para colonización.

Otra señal importante puede ser la cantidad de nutrimentos que se encuentran en los diferentes ambientes. Un ejemplo de esto es la glucosa, la cual es absorbida principalmente en la parte anterior del intestino de los mamíferos. Los operones fimbriales de EPEC (BFP) y *Vibrio cholerae* (TCP), organismos que colonizan principalmente la parte anterior del intestino, se expresan más eficientemente en presencia de glucosa (Puente *et al.*, 1996; Skorupski y Taylor, 1997).

Se ha propuesto que la regulación dependiente del medio de cultivo, se asocia a la duración de la fase exponencial. En LB su duración es de aproximadamente 3 horas, mientras que en DME se extiende por más de 5 horas. Esta diferencia parece permitir que se dé una mayor actividad transcripcional por célula en DME en comparación con el LB, aunque en ambos casos dicha actividad cesa en la entrada de la fase estacionaria donde otros elementos parecen regular negativamente estos genes (Puente *et al.*, 1996).

La combinación de diferentes señales ambientales puede indicar a la bacteria si se encuentra o no en un sitio adecuado para la colonización, y de esta

manera iniciar la expresión de los diferentes factores de virulencia en el nicho y en el momento adecuado (Edwards y Puente, 1998).

Muy recientemente, se ha reportado que el producto de *orf19* también se secreta por el sistema de secreción tipo III, codificado en el LEE, y que su blanco de acción es la mitocondria de la célula hospedera. Aunque aún no es claro su papel en virulencia, Map modifica el potencial de membrana de la mitocondria, afectando, probablemente, la liberación de efectores preapoptóticos, o las concentraciones de ATP/ADP (Kenny y Mark, 2000). Los datos de regulación del gen *orf19* obtenidos en este trabajo apoyan su importancia como un factor de virulencia de EPEC.

Los datos generados hasta el momento establecen que EPEC controla la expresión de sus genes de virulencia, a través de dos mecanismos principales (Figs. 2 y 6 ). Uno de éstos involucra un activador clásico, BfpT, que es indispensable para la activación de la expresión de los genes *bfpA* y *bfpT*. El otro mecanismo involucra a la proteína Ler, la cual actúa como un antagonista que contrarresta la acción de al menos dos reguladores negativos que actúan sobre los genes de la región LEE (Figs. 6 y 7). La acción de estos reguladores negativos involucra elementos reguladores presentes corriente arriba de los promotores de dichos genes. De esta manera, Ler es un regulador maestro que modula la expresión de los factores de virulencia de EPEC necesarios para la colonización íntima del intestino delgado proximal, y la generación de la lesión A/E (Figs. 2 y 6). La regulación coordinada de la expresión de los factores de virulencia en respuesta a condiciones en el ambiente permite a EPEC reconocer el sitio apropiado para generar una infección eficiente.

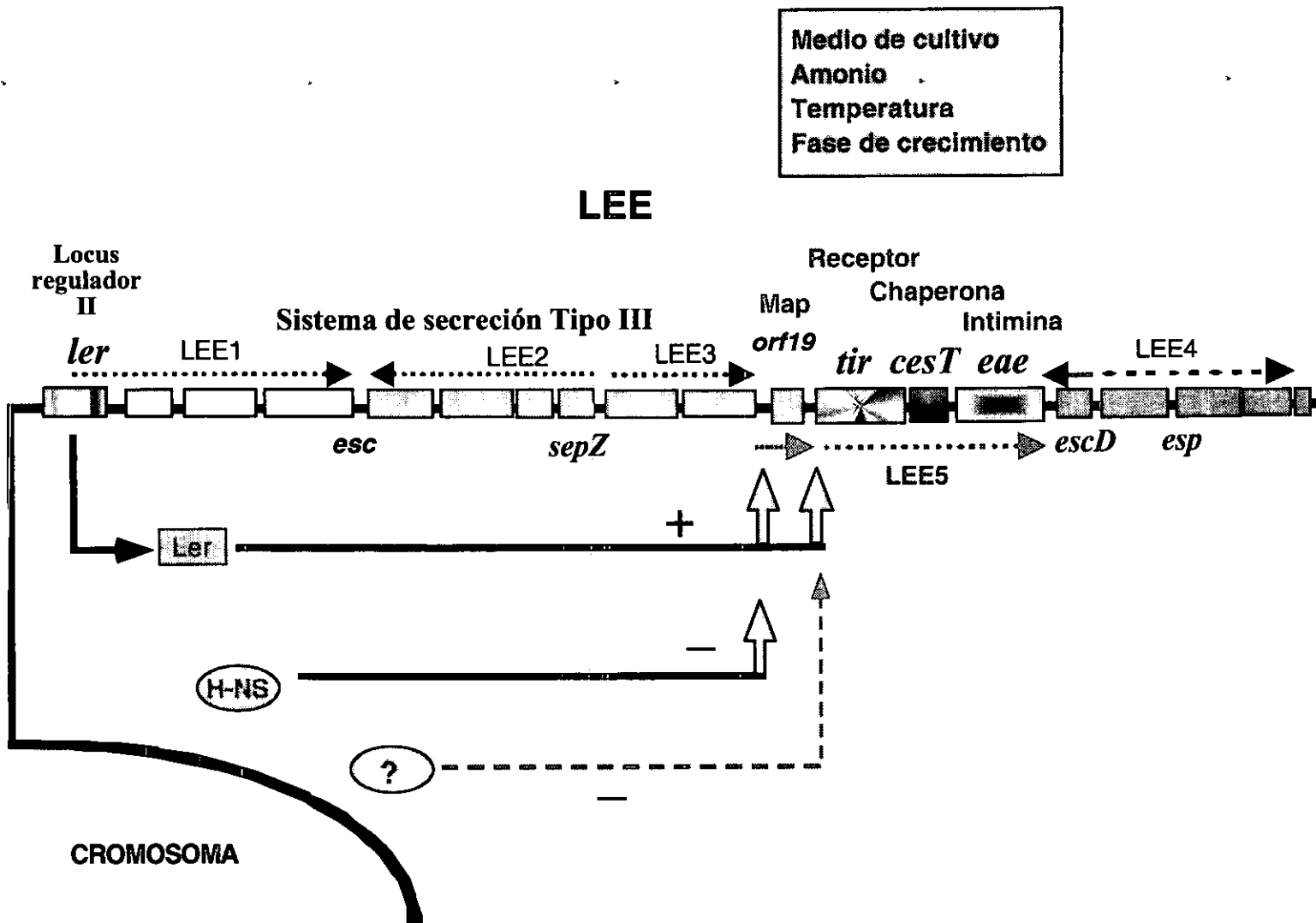


Figura 6. Resumen de resultados.

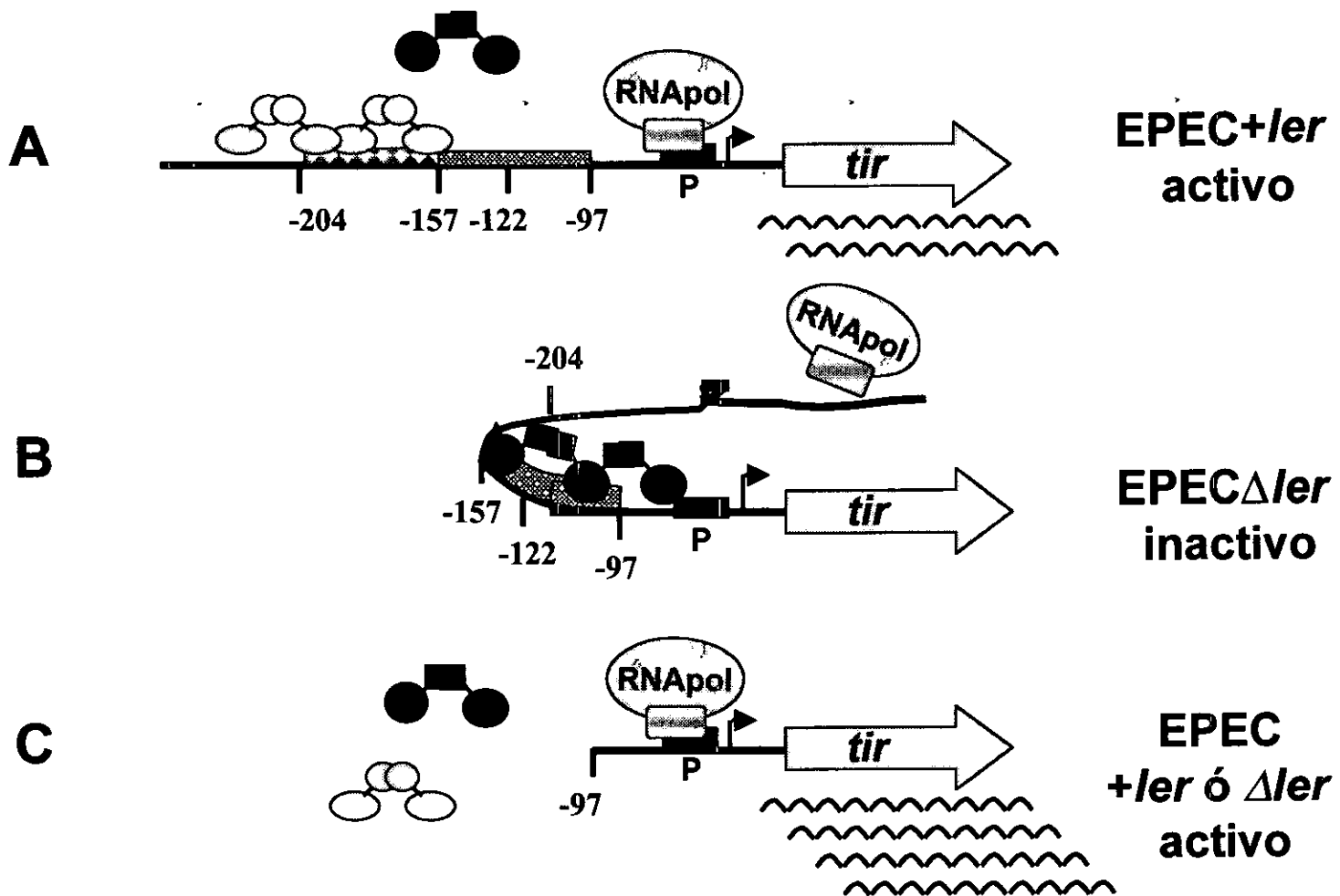



Figura 7


 Regulador  
 Negativo (?)  
 (H-NS para *orf19*)


 Ler



**Fig. 7. Modelo de regulación de *LEE5*.** A) En condiciones favorables para la expresión del operón *LEE5*, la proteína Ler podría estar interactuando con el DNA entre las regiones -157 y -204, evitando el pegado del posible represor, aún desconocido, y favoreciendo la interacción de la RNA polimerasa. En el caso de *orf19* la proteína represora es H-NS. B) En ausencia de la proteína Ler, el represor de *LEE5* estaría interactuando con el DNA entre las posiciones -97 y -157, promoviendo quizá la formación de alguna estructura que impediría el inicio de la transcripción. C) En ausencia de las secuencias involucradas en la regulación por Ler y por el factor negativo, el promotor de *LEE5* estaría disponible para comenzar la transcripción, presentándose niveles de expresión aún mayores a los promovidos por la acción de Ler.

Al inicio de este estudio se determinó que el locus regulador *bfpTVW* no tiene un efecto en la expresión del gen *orf19* y del operón *tir-cesT-eae*, ni en su regulación por factores en el medio. Considerando lo anterior, se planteó el estudio del papel de cada uno de los genes del locus regulador *bfpTVW* en la expresión y la regulación de otros genes de virulencia de EPEC tales como *bfpA* y *bfpT*. Este estudio se describe en el capítulo II de esta tesis.

En el segundo anexo de esta tesis se determinó que el gen *cesT*, localizado entre los genes *tir* y *eae* y anteriormente llamado *orfU*, produce la chaperona de Tir. Una mutación en *cesT* anula la secreción de Tir hacia el medio de cultivo y disminuye considerablemente los niveles de Tir en el citoplasma de la bacteria. La mutante en *cesT* presenta un comportamiento similar a una mutante en *tir*, ya que no induce los típicos rearrreglos del citoesqueleto producidos por EPEC en células epiteliales en cultivo.

El efecto de mutaciones en los genes que codifican para proteínas chaperonas se ha demostrado siempre a nivel de producción y secreción de sus proteínas blanco (Hueck, 1998; Cornelis y Van Gijsegem, 2000). En este caso, y considerando la disminución en los niveles de Tir, fue interesante demostrar si la mutación en *cesT* podría tener un efecto en la transcripción de *tir*.

Para esto se analizó la expresión de la fusión pTIR394 (denominada pTIR553 en el artículo) en EPEC E2348/69, EPEC E2348/69 $\Delta$ *tir* y EPEC E2348/69 $\Delta$ *cesT* (Fig. 4A, anexo 2). También se analizó la expresión del operón *LEE5* presente en el cromosoma de las mismas cepas, por medio de ensayos de "slot blot", que permiten detectar el RNA mensajero por medio de sondas marcadas radioactivamente (Fig. 4B, anexo 2). Este análisis demostró que la transcripción del operón fue similar en los tres diferentes fondos genéticos, indicando que el efecto de la mutación de *cesT* sobre los niveles de la proteína Tir es post-transcripcional.

## CONCLUSIONES

I) El gen *orf19* forma una unidad de transcripción monocistrónica, que inicia su transcripción 133 pares de bases corriente arriba del codón de inicio de la traducción.

II) Los genes *tir*, *cesT* y *eae* forman un operón, que inicia su transcripción 85 pares de bases corriente arriba del codón de inicio de la traducción de *tir*.

III) Se localizó un inicio de transcripción para *cesT*. Este promotor sólo fue activo en plásmido cuando se eliminó la región que comprende la región estructural del gen *cesT*, la región intergénica *cesT-eae* y los primeros 3 codones de *eae*.

IV) La expresión tanto del gen *orf19* como del operón *LEE5* no requieren del plásmido pEAF, por tanto no requieren del locus *bfpTVW*. Sin embargo, no se puede descartar que el locus tenga un papel regulador en la expresión de estos genes en alguna condición no probada.

V) El producto del gen *Ler* actúa como una proteína que contrarresta la represión de la expresión del operón *LEE5* y del gen *orf19*. La región de probable unión de la proteína *Ler* al promotor de *tir* se localiza entre las posiciones -204 y -157 corriente arriba del inicio de transcripción.

VI) La presencia de la región promotora -35 y -10 es suficiente para expresar el operón *LEE5*. La región corriente arriba comprendida entre las regiones -157 y -122 está involucrada en la modulación negativa y/o es blanco de un elemento represor. El regulador negativo de *orf19* es H-NS, y el de *tir* aún no ha sido definido; sin embargo, hemos descartado a las proteínas IHF, RpoN, RpoS, Fis, Lrp, CRP, Fur y la misma H-NS.

VII) El crecimiento en DME con 20mM de amonio, en medio de cultivo rico, así como a temperaturas de 25°C y 40°C, tiene un efecto represor sobre la expresión del operón *LEE5* y del gen *orf19*.

VIII) La regulación negativa que ejercen las temperaturas altas (40°C) sobre la expresión del operón *LEE5* requiere de elementos en *cis* localizados corriente arriba del promotor entre las regiones -203 y -156. La regulación que ejerce el amonio requirió la región entre las posiciones -156 y -121.

IX) La regulación que ejercen las temperaturas bajas (25°C) y el medio de cultivo rico sobre la expresión de *tir*, ocurre aún cuando sólo están presentes las regiones promotoras -35 y -10, lo que indica que esta regulación se da directamente sobre el promotor o corriente abajo de éste.

X) El operón *LEE5* y el gen *orf19* se expresan principalmente en la fase logarítmica y comienzan a disminuir al principio de la fase estacionaria. La expresión de *orf19* presenta una segunda fase de activación alrededor de la hora 11. El factor sigma RpoS podría estar involucrado en este efecto. Por otra parte, se demostró que el pEAF no tiene un efecto en la expresión de estos genes a lo largo de la curva de crecimiento.

## PERSPECTIVAS

De este trabajo surgen una serie de nuevas preguntas cuyas respuestas permitirán entender mejor la regulación de los genes del LEE. Las perspectivas del proyecto son enlistadas a continuación.

- Analizar la función del promotor localizado entre los genes *tir* y *cesT* por ensayos de "northern blot" o de protección a nucleasa S1.

- Delimitar y analizar la región de regulación negativa que se localiza entre los genes *cesT* y *eae*, utilizando fusiones al gen reportero *cat* que contengan diferentes remociones de dicha región. Evaluar su papel en la expresión del operón *LEE5* y del gen *cesT*.

- Determinar cuál es el regulador negativo del operón *LEE5* por medio de mutagénesis con transposones.

- Análisis de los elementos en *cis* de la región promotora de *tir* y *orf19* involucrados en la interacción con la proteína Ler, así como con su regulador negativo. Lo anterior se realizaría mediante el uso de fusiones transcripcionales, ensayos de retardamiento en geles, mutaciones sitio dirigidas, remociones de secuencia y ensayos de "footprinting".

- Analizar la región promotora de *orf19* mediante el uso de fusiones transcripcionales, para delimitar las regiones en *cis* involucradas en la regulación que establecen diferentes condiciones en el medio.

- Estudiar los mecanismos de regulación negativa del operón *LEE5* y del gen *orf19* en respuesta a la concentración de amonio, a la temperatura y al

crecimiento en LB, mediante la obtención de mutantes que sobrepasen esta regulación.

- Analizar si Ler requiere de proteínas reguladoras adicionales para liberar la represión del operón *LEE5* y del gen *orf19*.

- Analizar el papel del factor sigma RpoS en la regulación negativa del operón *LEE5* y del gen *orf19* durante la transición a fase estacionaria. Por otro lado, analizar si el aumento en la expresión de *orf19* en fase estacionaria depende de este factor sigma.

**Capítulo II**  
**El operón *bfpTVW* de EPEC.**

## **OBJETIVO PARTICULAR**

Estudiar el papel del locus *bfpTVW* en la regulación de los factores de virulencia de EPEC.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Evaluar el efecto de la sustracción en fase de cada uno de los genes del locus *bfpTVW* en la regulación de la expresión de los genes *bfpA* y *bfpT*.
- Evaluar el papel de los genes del locus *bfpTVW* en la regulación de la expresión de los genes *bfpA* y *bfpT* en respuesta a condiciones en el ambiente tales como temperatura, medio de cultivo y concentración de amonio.



## RESULTADOS

Como parte de nuestro interés en definir el papel del locus *bfpTVW* en la regulación de los genes de EPEC, este trabajo incluyó la caracterización inicial de la función de los componentes de este operón en la regulación de la expresión de los genes *bfpA* y *bfpT* de EPEC.

Como se mencionó anteriormente, *bfpTVW* es un locus regulador. El producto del primer gen, BfpT, es indispensable para la activación de la transcripción de *bfpA* y del mismo operón *bfpTVW* (Tobe *et al.*, 1996; Martínez-Laguna *et al.*, 1999). En este trabajo analizamos el papel de los componentes del operón en la regulación de los genes *bfpA* y *bfpT*. Para este efecto, se utilizaron las fusiones pCAT232 y pCAT166 (Puente *et al.*, 1996; Martínez-Laguna *et al.*, 1999) las cuales contienen la región promotora de *bfpA* y *bfpT*, respectivamente, fusionadas al gen reportero *cat*.

Por otro lado, partiendo del plásmido pTBA-BHI-3D que contiene al operón *bfpTVW* completo (Tobe *et al.*, 1996), se construyó una serie de plásmidos en el vector pWKS130 (Fig. 8), los cuales contienen el operón con la remoción en fase de uno o dos de los genes (ver materiales y métodos). Adicionalmente, se construyeron los plásmidos pTV<sub>C122</sub>1431 y pTV<sub>C31</sub>1431, los cuales contienen al gen *bfpT* completo y 122 y 31 codones del gen *bfpV*, respectivamente.

La serie de plásmidos derivados del pWKS130 fue utilizada para transformar la cepa de *E. coli* K12 MC4100. Asimismo, los diferentes fragmentos del operón *bfpTVW* fueron subclonados en el vector pMPM-K3 (Tabla 3), para poder transformar la cepa de EPEC.

Durante la construcción de las diferentes versiones del locus *bfpTVW*, un evento frecuente fue la aparición de mutaciones en la región reguladora del operón que impiden la adecuada expresión, en particular en aquellos plásmidos que portan el gen *bfpT*.

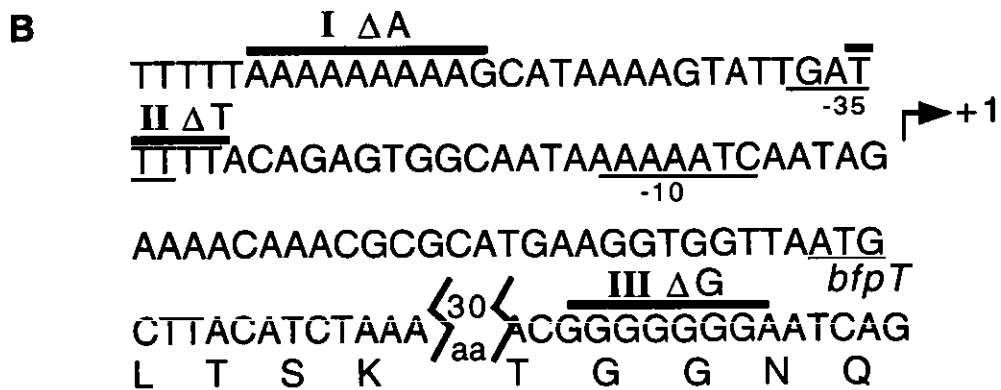
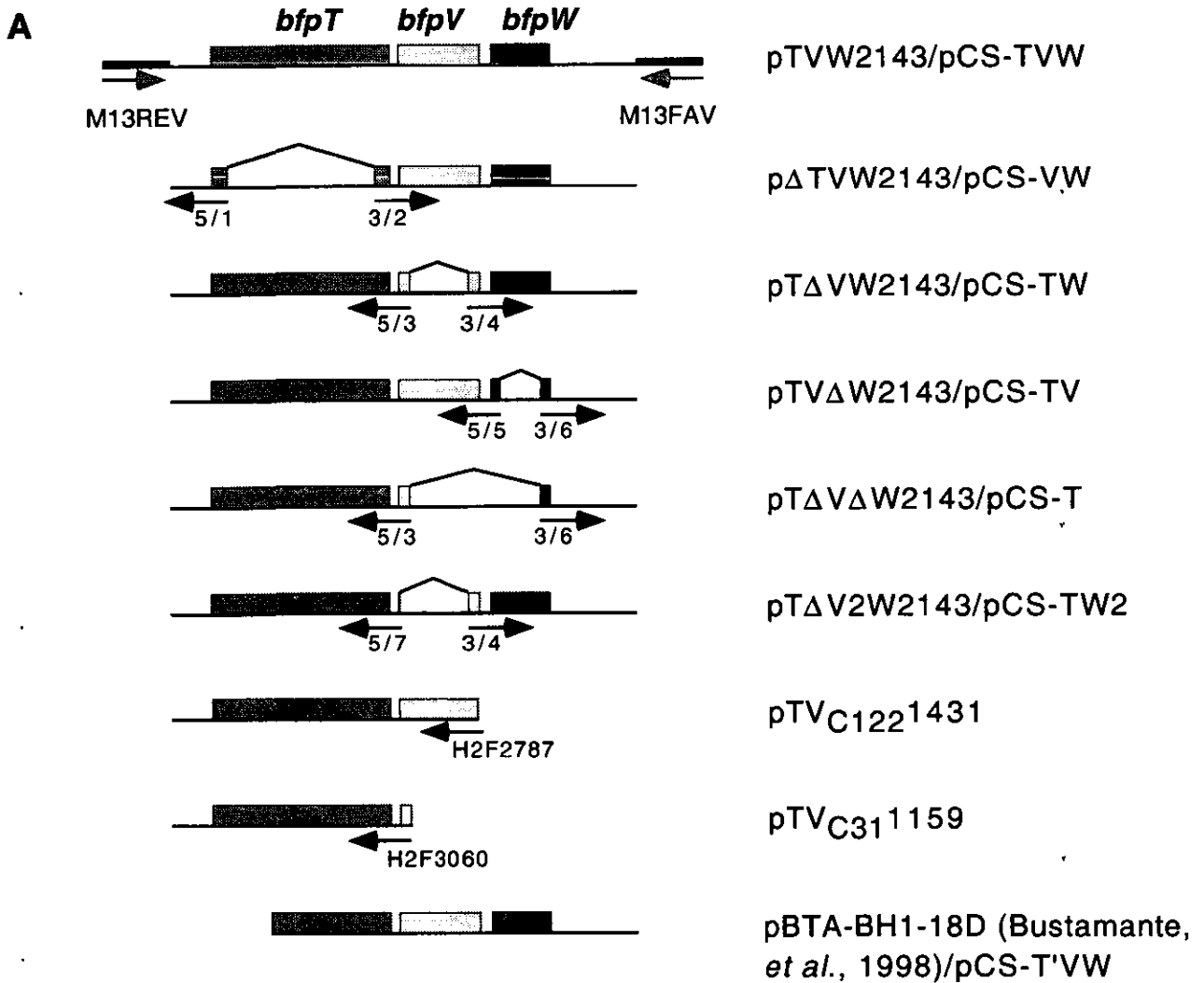
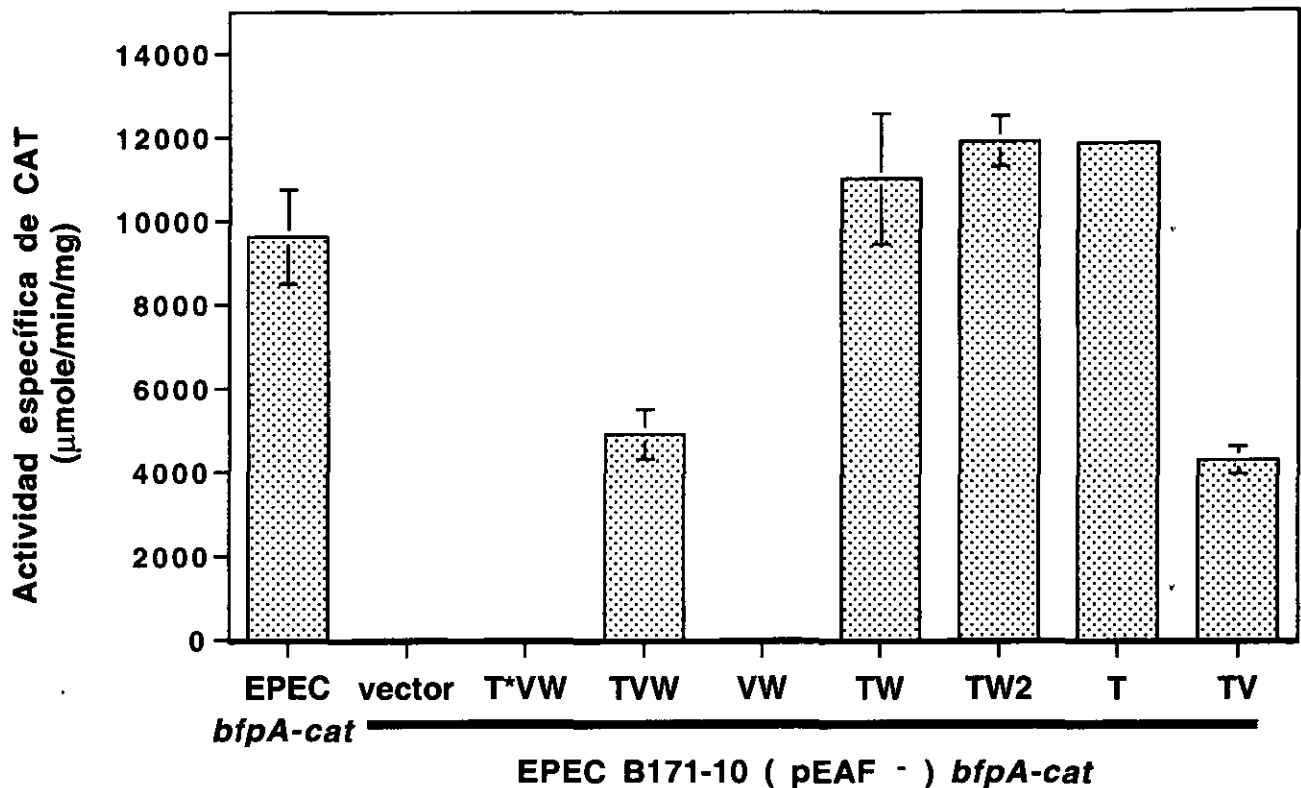


Figura 8

**Fig. 8. A) Representación esquemática de los plásmidos que contienen el operón *bfp* o los derivados que presentan la remoción en fase alguno de los genes.** Estos plásmidos fueron utilizados en experimentos de complementación de las fusiones transcripcionales de *bfpA* y *bfpT* en EPEC. Los oligonucleótidos utilizados para la construcción de cada plásmido (Tabla 4) son indicados por medio de flechas. **B) Secuencia de la región reguladora de *bfpT*,** donde se indican el inicio de transcripción del gen, las regiones -10 y -35, así como las tres regiones donde se encontraron mutaciones. En los tres casos, como se indica entre paréntesis, las mutaciones consistieron en la sustracción de un residuo. La primera se localizó 47 pb corriente arriba del inicio de transcripción de *bfpT*, en un trecho de A's que normalmente cuenta con 9 residuos. La segunda se localizó en la región -35 en un trecho que contiene normalmente 5 residuos de T. La tercer región mutada se localizó dentro de la región estructural, alrededor del codón 38, y normalmente cuenta con 7 residuos de G, esta mutación cambia la fase de lectura del gen.

Las mutaciones encontradas se muestran en la figura 8B de esta tesis. El análisis de la expresión de fusiones de *bfpT* al gen reportero *cat*, indicaron que la mutación en las 5 T's, localizadas junto a la región -35 del promotor de *bfpT*, reduce dramáticamente la actividad de este promotor (Fig. 8) (Martínez-Laguna *et al.*, 1999). Una posible explicación es que dichas mutaciones se fijaron en la población porque eliminaban el efecto tóxico que se da como resultado de la sobreproducción de BfpT. Para evitar este fenómeno, se decidió continuar el trabajo con plásmidos que, además de las diferentes versiones del operón *bfpTVW* (tabla 3), portan una mutación en el trecho de 5 T's localizado junto a la caja -35 del promotor de *bfpT* que lo inactiva, dejando la expresión del operón y todos sus derivados, bajo el control del promotor del vector.

Para determinar el papel de los componentes del operón *bfpTVW* en la regulación de *bfpA*, la cepa B171-10, la cual carece del plásmido pEAF y del plásmido críptico de 3 kb, se transformó con la fusión *bfpA-cat* y se complementó con los plásmidos derivados del pMPM-K3, que contienen al operón *bfpTVW* y sus diferentes remociones. Se monitoreó la expresión de la fusión en cada una de las cepas mediante la determinación de la actividad CAT, producida en cultivos en medio DME a 37°C. La figura 9 muestra la máxima expresión observada durante el cultivo, y se muestra la actividad de la fusión en la cepa de EPEC silvestre como control. Como se puede observar, la complementación con el locus completo generó niveles de expresión similares a los observados en la cepa silvestre. En contraste, la complementación con el vector dió niveles de expresión cercanos a cero. Por otro lado, la complementación con sólo el gen *bfpT* fue suficiente para activar la expresión de *bfpA*, y, como se esperaba, la remoción de este gen abatió la expresión. La complementación con los plásmidos donde se removió el gen *bfpV* mostró niveles de expresión relativamente mayores a los observados con el operón completo. La remoción de *bfpW* no tuvo un efecto en la expresión de *bfpA* (Fig. 9).



**Fig. 9.** La presencia del gen *bfpV* tiene un efecto modulador negativo sobre la expresión del gen *bfpA*. Se analizó el papel de cada uno de los genes del operón *bfpTVW* en la expresión del gen *bfpA*. Para esto se midió la actividad de CAT de la fusión transcripcional *bfpA-cat*, transformada en la cepa de EPEC B171-10 que carece del pEAF, y complementada con la serie de plásmidos derivados del pMPM-K3 (tabla 3), los cuales contienen al operón completo o la remoción de alguno de los genes del mismo. La actividad de CAT está expresada como actividad específica. Como control se incluye la actividad de la fusión *bfpA-cat* en la cepa de EPEC silvestre B171-8.

Para definir si estas observaciones eran reproducibles en una cepa de *E. coli* no patógena, se utilizó la cepa MC4100. Esta cepa se seleccionó porque presentó una cinética de crecimiento similar a EPEC en medio DME (Datos no mostrados). De esta manera, las fusiones *bfpA-cat* y *bfpT-cat* se transformaron en la cepa MC4100 y se complementaron con el juego de plásmidos que contienen el operón *bfpTVW* completo y sus derivados. La complementación con el operón completo mostró niveles de activación similares a los observados en EPEC silvestre, tanto de *bfpA* como de *bfpT*, indicando que el operón es suficiente para promover la activación de estos genes en un fondo genético distinto al de EPEC. Como se observó en la cepa de EPEC B171-10, la expresión tanto de *bfpA* como de *bfpT* en MC4100 se abatió cuando se removió el gen *bfpT*. Para ambas fusiones, la expresión fue relativamente mayor cuando se removió el gen *bfpV* (Fig. 10). Cuando se utilizaron los plásmidos pTV<sub>C122</sub>1431 y pTV<sub>C31</sub>1431 para complementar las fusiones a *cat*, éstas fueron activas; sin embargo, en aquella que sólo incluye 31 codones de *bfpV* la actividad fue mayor a la observada con el gen *bfpW* casi completo (122 de 130 codones). Lo anterior indicó que el producto del gen *bfpT* por sí solo activa la expresión de los genes *bfpT* y *bfpA* y que el producto de *bfpV* tiene un papel modulador sobre la expresión de estos genes.

Ya que *bfpA* se activa directamente por BfpT, pensamos que la regulación que ejerce *bfpV* sobre *bfpA* podría ser consecuencia de la regulación ejercida directamente sobre el promotor de *bfpT*. Para analizar lo anterior, se determinó la expresión de *bfpT*, a partir de los diferentes plásmidos que llevan el operón completo o con la remoción de alguno de sus componentes transformados en la cepa de EPEC B171-10. Para esto, se obtuvo RNA total de cada cepa y se realizó un ensayo de hibridación por la técnica de "slot blot", usando al gen (*bfpT*) como sonda. Como un control de la cantidad y calidad del RNA total se utilizó una sonda que hibrida con el RNAr 16S. En el ensayo se incluyó RNA total de una cepa de EPEC silvestre, que contiene el pEAF, como control positivo (Fig. 11).

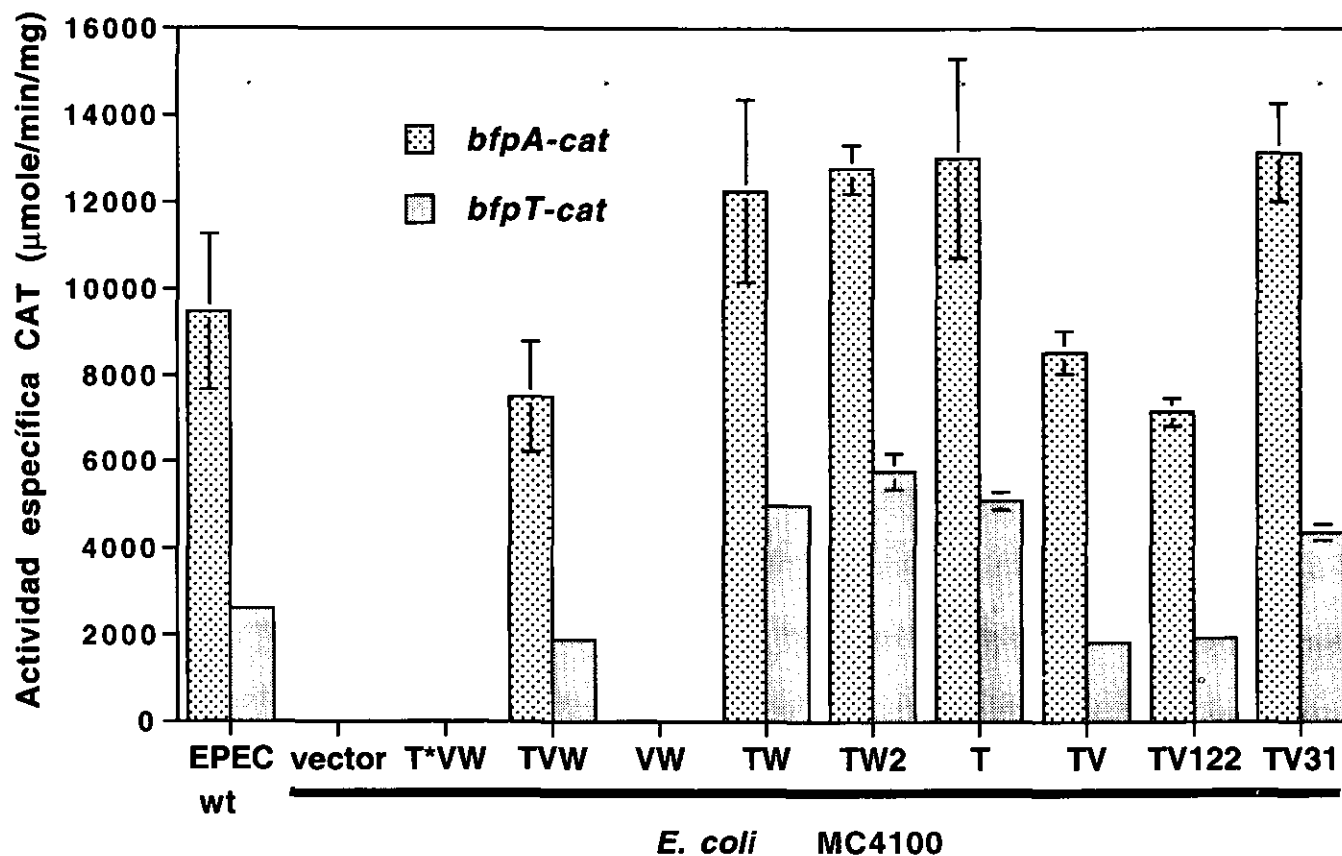


Fig. 10. La presencia del gen *bfpV* tiene un efecto modulador negativo sobre la expresión de los genes *bfpA* y *bfpT*, aún en la cepa de *E. coli* K12 no patógena. Se analizó el papel de cada uno de los genes del operón *bfpTVW* en la expresión de los genes *bfpA* y *bfpT* en la cepa *E. coli* MC4100, complementada con los derivados del plásmido pWKS130 (tabla 3), como se describió en la figura 9.

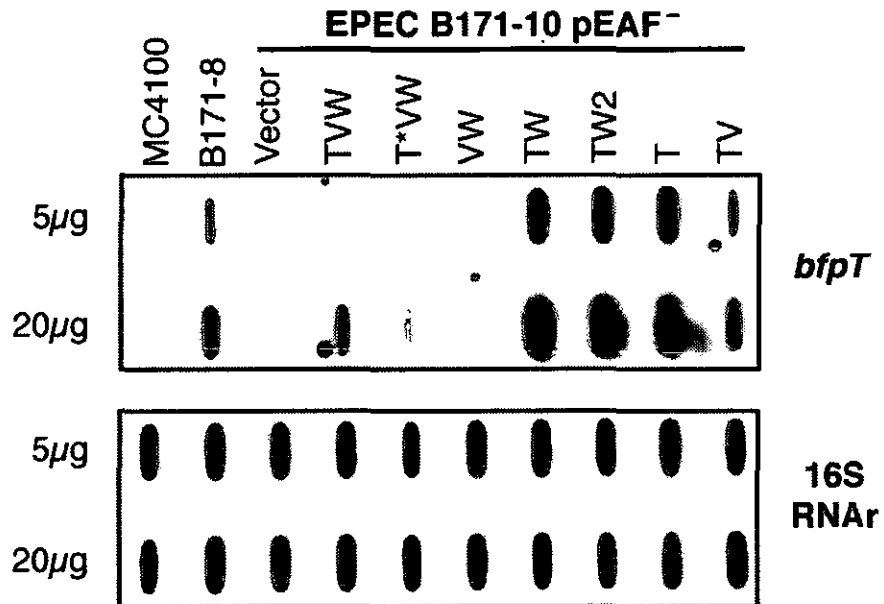


Fig. 11. BfpV es un modulador negativo que disminuye la cantidad de RNA mensajero del gen *bfpT*. Para analizar el efecto del operón *bfpTVW* sobre la producción del mensajero de *bfpT* se realizó un ensayo de "slot blot" (materiales y métodos). RNA total fue purificado a partir de la cepa de EPEC B171-10 conteniendo los diferentes plásmidos que llevan el operón *bfpTVW* y sus derivados. Para la detección se utilizó una sonda de DNA específica para el gen *bfpT* marcada radioactivamente. Como control de la cantidad y de la calidad del RNA empleado se utilizó una sonda específica para el RNA ribosomal 16S. Como control negativo se utilizó RNA total purificado de una cepa de *E. coli* K12 MC4100, y como un control positivo se utilizó la cepa de EPEC silvestre B171-8. Arriba de cada carril se indican los genes del operón presentes en los plásmidos utilizados, o la cepa utilizada.



La expresión de *bfpT* a partir del plásmido pTVW2143 en la cepa B171-10 fue considerablemente menor a la observada para los plásmidos pTΔVW2143, y pTΔV2W2143, donde se removió el gen *bfpV*. Este efecto también se observó con el plásmido pTΔVΔW2143 en el cual se removieron los genes *bfpV* y *bfpW*. La remoción del gen *bfpW* no tuvo el mismo efecto, y la señal obtenida fue muy parecida a aquella generada con el operón completo. Lo anterior ratificó que es la ausencia de *bfpV* lo que genera un aumento en el mensajero de *bfpT*.

Se analizó si el efecto observado con la remoción de *bfpV* se reproducía en un fondo genético de *E. coli* K12, y si la complementación con *bfpV* en *trans* era capaz de restituir los niveles de expresión observados con el operón completo. Para lo anterior, una cepa de MC4100 que contiene el plásmido pbfpΔTVW-cat (Tabla 3), el cual lleva el gen *bfpV* bajo el control del promotor propio del operón, se transformó con la serie de plásmidos que llevan el operón *bfpTVW* y sus derivados, y se realizó un ensayo de "slot blot" para monitorear la expresión de *bfpT*. Como se muestra en la figura 12, al igual que en la cepa B171-10, en ausencia de *bfpV* se incrementan los niveles de expresión de *bfpT*, mientras que la complementación en *trans* con el gen *bfpV* reduce su expresión a los niveles de mensajero observados con el operón completo.

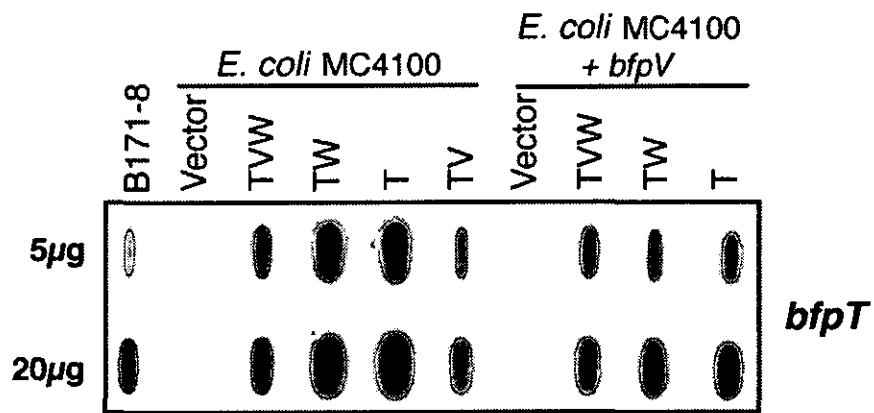


Fig. 12. La función de BfpV como modulador negativo puede ser complementada en trans. Se analizó el papel del gen *bfpV* sobre la producción del RNA mensajero del gen *bfpT* (como en la figura 10), utilizando la cepa *E. coli* MC4100 y, en los casos que se indica, complementando con el gen *bfpV* en otro plásmido (+ *bfpV*).

Estos resultados indicaron que el gen *bfpV* probablemente codifica para una proteína que actúa en *trans*, la cual tiene un efecto modulador negativo en la expresión del mensajero del operón *bfpTVW*. Asimismo, mostraron que no se requiere de elementos adicionales específicos de EPEC para este efecto. Será importante definir si la función de BfpV es en la transcripción, o en la estabilidad del mensajero.

Los genes *bfpA* y *bfpT* son regulados en respuesta a la temperatura, el medio de cultivo y la concentración de amonio (Puente *et al.*, 1996; Bustamante *et al.*, 1998; Martínez-Laguna *et al.*, 1999). Considerando lo anterior, analizamos la importancia de los genes *bfpTVW* en la regulación por las condiciones señaladas, así como la importancia del fondo genético. Para esto analizamos la expresión de las fusiones *bfpA-cat* y *bfpT-cat* en la cepa de *E. coli* MC4100 complementada con el locus *bfpTVW* o con sus derivados, a 37°C en medio DME, DME más 20mM de amonio o medio de cultivo LB, así como en DME a 25°C y a 40°C (Tablas 6 y 7). Bajo estas condiciones se observó que el crecimiento en medio de cultivo LB o en medio DME con amonio a 37°C, o en DME a 40°C, no tuvo un efecto represor en la expresión de *bfpA* y *bfpT*, pues los niveles observados fueron similares a los obtenidos en DME a 37°C. En contraste con lo anterior, se observó que en la cepa de EPEC B171-10 la represión de la expresión de *bfpA* en LB o DME con amonio se mantiene, indicando que ningún otro componente del pEAF, incluyendo a los genes *bfpV* o *bfpW*, es necesario para tal regulación y que los elementos específicos de EPEC, que actúan como reguladores negativos en estas condiciones, son necesarias para que se lleve a cabo la represión (Tabla 8). Esta cepa no creció bien a 40°C (datos no mostrados), por tanto no se pudo definir si la represión por este factor fue afectada. La expresión de *bfpT* en la cepa de EPEC B171-10 también fue reprimida en las condiciones mencionadas arriba (Martínez-Laguna *et al.*, 1999).

**Tabla 6.**  
**Regulación de *bfpA-cat* en *E. coli* MC4100 en respuesta al medio de cultivo, a la presencia de amonio y a la temperatura.**

**Condición probada**

<b>Cepas <sup>a</sup></b>	<b>DME 37°C</b>	<b>LB 37°C</b>	<b>DME Amonio 20mM 37°C</b>	<b>DME 25°C</b>	<b>DME 40°C</b>
<b>EPEC B171-8 wt</b>	9470 <sup>b</sup>	3500	818	1882	498
<b>MC4100 pWKS130<sup>c</sup></b>	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
<b>MC4100 pTVW2143</b>	7489	7900	7350	1501	6300
<b>MC4100 pBHI-18D</b>	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
<b>MC4100 pΔTVW2143</b>	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
<b>MC4100 pTΔVW2143</b>	12250	14961	11346	2021	11369
<b>MC4100 pTΔV2W2143</b>	12763	16740	12596	2074	12368
<b>MC4100 pTΔVΔW2143</b>	13001	14210	15500	2455	13158
<b>MC4100 pTVΔW2143</b>	8531	7961	5490	1359	7681

- a) Todas las cepas contienen la fusión *bfpA-cat* (pCAT201).  
b) La actividad específica de CAT fue determinada de muestras tomadas de cada cepa cultivada en las condiciones indicadas a una D.O.<sub>600nm</sub> de 1.4. Los promedios son el resultado de al menos tres experimentos diferentes. Las desviaciones son menores al 10% (dato no mostrado).  
c) Los plásmidos utilizados para complementar la cepa *E. coli* MC4100 son derivados del vector pWKS130 (tabla 2).

Tabla 7.

Regulación de *bfpT-cat* en *E. coli* MC4100 en respuesta al medio de cultivo, a la presencia de amonio y a la temperatura.

Condición probada

Cepas <sup>a</sup>	DME 37°C	LB 37°C	DME Amonio 20mM 37°C	DME 25°C	DME 40°C
EPEC B171-8 wt	2612 <sup>b</sup>	800	234	1015	268
MC4100 pWKS130 <sup>c</sup>	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
MC4100 pTVW2143	1880	3320	2500	659	1450
MC4100 pBHI-18D	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
MC4100 pΔTVW2143	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
MC4100 pTΔVW2143	4967	6198	5900	799	3650
MC4100 pTΔV2W2143	5765	5989	6350	854	4628
MC4100 pTΔVΔW2143	5078	6972	8000	954	4698
MC4100 pTVΔW2143	1821	2837	2044	350	1459

- a) Todas las cepas contienen la fusión *bfpT-cat* (pCAT166).  
 b) La actividad específica de CAT fue determinada de muestras tomadas de cada cepa cultivada en las condiciones indicadas a una D.O.<sub>600nm</sub> de 1.4. Los promedios son el resultado de al menos tres experimentos diferentes. Las desviaciones son menores al 10% (dato no mostrado).  
 c) Los plásmidos utilizados para complementar la cepa *E. coli* MC4100 son derivados del vector pWKS130 (tabla 2).

**Tabla 8.**  
**Regulación de *bfpA-cat* en EPEC B171-10 (pEAF-) en respuesta al medio de cultivo, a la presencia de amonio y a la temperatura.**

Cepas <sup>a</sup> con <i>bfpA-cat</i>	Condición probada			
	DME 37°C	LB 37°C	DME Amonio 20mM 37°C	DME 25°C
EPEC B171-8 wt	9619 <sup>b</sup>	1762	96	689
EPEC B171-10 pMPM-K3 <sup>c</sup>	< 20	< 20	< 20	< 20
EPEC B171-10 pCS-TVW	4898	43	89	536
EPEC B171-10 pCS-T'VW	< 20	< 20	< 20	< 20
EPEC B171-10 pCS-VW	< 20	< 20	< 20	< 20
EPEC B171-10 pCS-TW	11005	3206	85	2205
EPEC B171-10 pCS-TW2	11900	3327	74	1698
EPEC B171-10 pCS-T	11847	3036	89	2256
EPEC B171-10 pCS-TV	4274	1484	85	852

- a) Todas las cepas contienen la fusión *bfpA-cat* (pCAT201).
- b) La actividad específica de CAT fue determinada de muestras tomadas de cada cepa cultivada en las condiciones indicadas a una D.O.<sub>600nm</sub> de 1.4. Los promedios son el resultado de al menos tres experimentos diferentes. Las desviaciones son menores al 10% (dato no mostrado).
- c) La serie de plásmidos utilizados para complementar la cepa EPEC B171-10 se derivó del vector pMPM-K3 (tabla 2).

Lo anterior indicó también que los productos de los genes *bfpTVW* por sí solos no son los responsables de la represión ejercida por esas condiciones en el ambiente, y que se requiere de elementos específicos de EPEC para que se realice.

Interesantemente, la represión de la expresión de los genes *bfpA* y *bfpT* a 25°C sí se observa tanto en la cepa MC4100 como en la cepa B171-10, lo que sugiere la existencia de un regulador global que comparten EPEC y cepas de *E. coli* no patógenas.

## DISCUSION

El operón *bfpTVW* es uno de los dos principales loci reguladores de los factores de virulencia de EPEC (Tobe *et al.*, 1996).

En este trabajo demostramos que el producto del gen *bfpV* actúa como modulador negativo sobre la expresión del gen *bfpA* y del operón *bfpTVW*. Al analizar el punto de acción de *bfpV*, observamos que la cantidad de mensajero de *bfpT*, aún cuando el operón está bajo el control de otro promotor, por lo que consideramos que la modulación negativa de la expresión del gen *bfpA* es un reflejo directo del efecto de *bfpV* sobre la expresión del activador BfpT. La ausencia del gen *bfpW* no afectó la expresión de los genes *bfpA* y *bfpT*.

A pesar de que la aparición de mutantes en el promotor del operón *bfpTVW* representó una limitante al inicio de este proyecto, esta observación indicó que el fenómeno sucede en EPEC con frecuencia, y será necesario definir si tiene una importancia biológica. En bacterias se ha observado que existen mecanismos de variación de fase que modulan la producción de factores de virulencia. Un ejemplo de esto se da en la expresión de los genes *pilE* y *pilC* de *Neisseria gonorrhoeae*, donde un cambio de fase originado en trechos ricos en el residuo G genera proteínas inactivas que no permiten el ensamblaje de los pili en la membrana bacteriana. (Jonsson *et al.*, 1991; Makino *et al.*, 1991). En EPEC este fenómeno podría significar que una parte de la población bacteriana no coloniza el intestino, ya que no expresaría la fimbria, y podría ser liberada del hospedero para su dispersión. Por otro lado, BfpT

pertenece a la familia de activadores de la transcripción XylS-AraC (Gómez-Duarte y Kaper, 1995; Tobe *et al.*, 1996), y no se puede descartar que las mutaciones en el promotor se fijen como resultado de la presión que ejerce la presencia de este regulador en multicopia, ya que estas proteínas normalmente se presentan en muy bajos niveles en las células.

El producto del gen *bfpV* no presenta homología con ninguna proteína reportada, y tampoco posee motivos de unión a DNA u otros que indiquen alguna función específica. *bfpV* puede ejercer su efecto modulador en *trans*, lo que indica que el producto de este gen podría actuar directamente sobre el promotor del operón *bfpTVW*, o modifica algún factor involucrado en la activación de éste, como el mismo BfpT por ejemplo. Algunos datos generados en el laboratorio indicaron que los tres genes del operón pueden ser traducidos (Sosa, 1999), lo cual apoya el hecho de que el producto de *bfpV* pueda actuar en *trans*.

Al analizar el papel de los genes del operón *bfpTVW* en la regulación por diferentes condiciones en el medio, tales como temperatura, medio de cultivo y amonio, observamos que la ausencia de los genes *bfpV* y *bfpW* no tuvo un efecto en dicha regulación (Tabla 8). Cuando se analizó la importancia del fondo genético en la regulación por dichas condiciones en el medio, se observó que la represión en respuesta al crecimiento en medio de cultivo rico LB, a las temperaturas altas y a la presencia de amonio, requiere de elementos específicos de EPEC que no están presentes en *E. coli* K12 (Tabla 6, 7 y 8). En contraste, la regulación por temperaturas bajas sí pudo ser reproducida en esta cepa lo que indica que los elementos asociados a dicha regulación están presentes tanto en *E. coli* no patógena, como en EPEC. Por estar asociada a este tipo de regulación (Atlung and Ingmer, 1997), la proteína H-NS fue el primer candidato a probar. Un análisis reciente realizado en el laboratorio, mostró que esta proteína está involucrada en la represión de la expresión del gen *bfpA* a 25°C (Ibarra, 2001, datos no publicados).



Por otro lado, el gen *bfpW* fue involucrado en la regulación del gen *eae*, localizado en la isla de patogenicidad LEE (Gómez-Duarte y Kaper, 1995). Como se demostró en la primera parte de esta tesis, el gen *eae* forma parte del operón *LEE5*, y el locus *bfpTVW* no es necesario para la expresión de dicho operón. Un trabajo reciente indicó que el gen *bfpW* es capaz de activar la expresión del gen *ler* (Bustamante *et al.*, 2001), aunque aún no es claro como se lleva a cabo este mecanismo, ya que la proteína IHF también es necesaria para activar el promotor de *ler* (Friedberg *et al.*, 1999).

Los plásmidos generados en este trabajo, los cuales contienen el locus *bfpTVW* completo o con la remoción de cada uno de los genes, han permitido analizar el papel de cada uno de estos genes en la expresión de otros factores de virulencia de EPEC como los genes *ler*, *sep*, *esp* y *tir-cesT-eae*. Los resultados de esta sección constituyen tan sólo el inicio del análisis de la función de los genes *bfpV* y *bfpW*. Ambos genes representan un nuevo tipo de proteínas involucradas en regulación, ya que no presentan homología con algún regulador descrito hasta el momento (Tobe *et al.*, 1996).

Con las observaciones hechas en este trabajo se abre una gran cantidad de nuevas preguntas sobre la regulación de los factores de virulencia de EPEC. Innumerables esfuerzos para purificar las proteínas codificadas por el operón han permitido recientemente la purificación de BfpT (Ibarra, 2001, datos no publicados), sin embargo, aún continúa el proceso de obtención de BfpV y BfpW. Contar con estas proteínas permitirá avanzar en el análisis funcional de las mismas.

## CONCLUSIONES

I) El producto del gen *bfpV* modula negativamente la expresión del operón *bfpTVW*, afectando directamente la cantidad de transcrito de *bfpT*, e indirectamente la expresión del gen *bfpA*.

II) La regulación negativa ejercida sobre la expresión de los genes *bfpA* y *bfpT* por crecimiento en medio LB, en presencia de amonio y a temperaturas altas (40°C), es dependiente de elementos presentes y, probablemente, específicos de EPEC e independientes de *bfpTVW*.

## PERSPECTIVAS

- Construcción de mutantes de EPEC donde se remueva cada uno de los genes del operón *bfpTVW* en el pEAF, para analizar su efecto en la regulación de la expresión de los genes de virulencia de EPEC.

- Analizar la frecuencia de la aparición de mutaciones en el promotor del operón *bfpTVW*, así como su frecuencia de reversión, y definir si este mecanismo es una forma de variación de fase que modula la virulencia de EPEC.

- Caracterizar funcional y estructuralmente a las proteínas BfpV y BfpW.

- Identificar y caracterizar los elementos reguladores involucrados en la respuesta al crecimiento en medio de cultivo rico, a 40°C y en presencia de amonio.

- Buscar otros genes de virulencia regulados por los productos del operón *bfpTVW*.

## BIBLIOGRAFIA

- Abe, A., de Grado, M., Pfuetzner, R.A., Sánchez-SanMartín, C., DeVinney, R., Puente, J.L., Strynadka, N.C.J. and Finlay, B.B. (1999) Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion. *Mol Microbiol* **33**: 1162-1174.
- Atlung, T. and Ingmer, H. (1997) H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol Microbiol* **24**: 7-17.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons., New York.
- Bain, C. Keller, R. Collington, G. K. Trabulsi, L. R. Knutton, S. (1998) Increased levels of intracellular calcium are not required for the formation of attaching and effacing lesions by enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **66**: 3900-3908.
- Baldwin, T.J., Brooks, S.F., Knutton, S., Manjarrez Hernandez, H.A., Aitken, A. and Williams, P.H. (1990) Protein phosphorylation by protein kinase C in HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **58**: 761-765.
- Baldwin, T.J., Lee-Delaunay, M.B., Knutton, S. and H., W.P. (1993) Calcium-cadmodulin dependence of actin accretion and lethality in cultured HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **61**: 760-763.
- 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.
- Bustamante, V.H. (1998) Regulación transcripcional del gen *bfpA* de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). *Microbiología Molecular*, IBT. UNAM, Cuernavaca, Morelos, p. 65.

- Bustamante, V.H., Calva, E. and Puente, J.L. (1998) Analysis of *cis*-acting elements required for *bfpA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 3013-3016.
- Bustamante, V.H., Santana, F.J., Calva, E. and Puente, J.L. (2001) Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC): Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* **39**: 664-678.
- Calderwood, S.B. and Mekalanos, J.J. (1988) Confirmation of the Fur operator site by insertion of a synthetic oligonucleotide into an operon fusion plasmid. *J Bacteriol* **170**: 1015-1017.
- Caramel, A. and Schnetz, K. (1998) Lac and lambda repressors relieve silencing of the *Escherichia coli bgl* promoter. Activation by alteration of a repressing nucleoprotein complex. *J Mol Biol* **284**: 875-883.
- Casadaban, M.J. (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**: 541-555.
- Cava, J.R., Elias, P.M., Turowski, D.A. and Noel, K.D. (1989) *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genetic regions encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on bean plants. *J Bacteriol* **171**: 8-15.
- Colland, F., Barth, M., Hengge-Aronis, R. and Kolb, A. (2000) sigma factor selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: role for CRP, IHF and Lrp transcription factors. *Embo J* **19**: 3028-3037.
- Cornelis, G.R. and Van Gijsegem, F. (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **54**: 735-774.
- Cravioto, A., Gross, R., Scotland, S. and Rowe, B. (1979) An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* **3**: 95-99.
- de Grado, M., Abe, A., Gauthier, A., Steele-Mortimer, O., DeVinney, R. and Finlay, B.B. (1999) Identification of the intimin binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **1**: 7-17.

- DeVinney, R., Gauthier, A., Abe, A. and Finlay, B.B. (1999) Enteropathogenic *Escherichia coli*: a pathogen that inserts its own receptor into host cells. *Cell Mol Life Sci* **55**: 961-976.
- DiRita, V.J., Engleberg, N.C., Heath, A., Miller, A., Crawford, J.A. and Yu, R. (2000) Virulence gene regulation inside and outside. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 657-665.
- 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.
- Donnenberg, M.S., Yu, J. and Kaper, J.B. (1993) A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J Bacteriol* **175**: 4670-4680.
- Dorman, C.J., Hinton, J.C. and Free, A. (1999) Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. *Trends Microbiol* **7**: 124-128.
- Dytoc, M., Fedorko, L. and Sherman, P.M. (1994) Signal transduction in human epithelial cells infected with attaching and effacing *Escherichia coli* in vitro. *Gastroenterology* **106**: 1150-1161.
- Edwards, R.A. and Puente, J.L. (1998) Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol* **6**: 282-287.
- Edwards, R.A., Schifferli, D.M. and Maloy, S.R. (2000) A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1258-1262.
- Elliott, S.J., Hutcheson, S.W., Dubois, M.S., Mellies, J.L., Wainwright, L.A., Batchelor, M., Frankel, G., Knutton, S. and Kaper, J.B. (1999) Identification of CstT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**: 1176-1188.
- Elliott, S.J., Sperandio, V., Giron, J.A., Shin, S., Mellies, J.L., Wainwright, L., Hutcheson, S.W., McDaniel, T.K. and Kaper, J.B. (2000) The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both

- LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**: 6115-6126.
- Elliott, S.J., Wainwright, L.A., McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Deng, Y.K., Lai, L.C., McNamara, B.P., Donnenberg, M.S. and Kaper, J.B. (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* **28**: 1-4.
- Falconi, M., Colonna, B., Prosseda, G., Micheli, G. and Gualerzi, C.O. (1998) Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. *EMBO J* **17**: 7033-7043.
- Foubister, V., Rosenshine, I., Donnenberg, M.S. and Finlay, B.B. (1994a) The *eaeB* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* is necessary for signal transduction in epithelial cells. *Infect Immun* **62**: 3038-3040.
- Foubister, V., Rosenshine, I. and Finlay, B.B. (1994b) A diarrheal pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), triggers a flux of inositol phosphates in infected epithelial cells. *J Exp Med* **179**: 993-998.
- Frankel, G., Phillips, A.D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J.B. and Knutton, S. (1998) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* **30**: 911-921.
- Friden, P., Voelkel, K., Sternglanz, R. and Freundlich, M. (1984) Reduced expression of the isoleucine and valine enzymes in integration host factor mutants of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **172**: 573-579.
- Friedberg, D., Umanski, T., Fang, Y. and Rosenshine, I. (1999) Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **34**: 941-952.
- Garrett, S., Taylor, R.K., Silhavy, T.J. and Berman, M.L. (1985) Isolation and characterization of delta *ompB* strains of *Escherichia coli* by a general method based on gene fusions. *J Bacteriol* **162**: 840-844.
- Giron, J.A., Ho, A.S. and Schoolnik, G.K. (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**: 710-713.

- Gómez-Duarte, O.G. and Kaper, J.B. (1995) A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**: 1767-1776.
- Gottesman, M.E. and Yarmolinsky, M.B. (1968) Integration-negative mutants of bacteriophage lambda. *J Mol Biol* **31**: 487-505.
- Guterman, S.K. and Howitt, C.L. (1979) Rho and ribosome mutation interaction: lethality of *rho-15* in *rpsL* or *rpsE* strains, and *rho-15* methionine auxotrophy in *rps+* strains of *Escherichia coli*. *Genetics* **93**: 353-360.
- Harel, J. and Martin, C. (1999) Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Res* **30**: 131-155.
- Hartland, E.L., Batchelor, M., Delahay, R.M., Hale, C., Matthews, S., Dougan, G., Knutton, S., Connerton, I. and Frankel, G. (1999) Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Mol Microbiol* **32**: 151-158.
- Hartland, E.L., Daniell, S.J., Delahay, R.M., Neves, B.C., Wallis, T., Shaw, R.K., Hale, C., Knutton, S. and Frankel, G. (2000) The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions. *Mol Microbiol* **35**: 1483-1492.
- Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- 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 putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7996-8000.
- Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D. and Kaper, J.B. (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7839-7843.
- Jonsson, A.B., Nyberg, G. and Normark, S. (1991) Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in *pilC*, a novel gene for pilus assembly. *EMBO J* **10**: 477-488.

- Jordi, B.J., Dagberg, B., de Haan, L.A., Hamers, A.M., van der Zeijst, B.A., Gaastra, W. and Uhlin, B.E. (1992) The positive regulator CfaD overcomes the repression mediated by histone-like protein H-NS (H1) in the CFA/I fimbrial operon of *Escherichia coli*. *EMBO J* **11**: 2627-2632.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A. and Finlay, B.B. (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**: 511-520.
- Kenny, B. and Finlay, B.B. (1995) Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7991-7995.
- 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-g1. *Infect Immun* **65**: 2528-2536.
- Kenny, B., Lai, L.C., Finlay, B.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 Mark, J. (2000) Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. *Cell Microbiol* **2**: 579-590.
- 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.
- 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.
- Lange, R., Barth, M. and Hengge-Aronis, R. (1993) Complex transcriptional control of the sigma s-dependent stationary- phase-induced and



- osmotically regulated *osmY* (*csi-5*) gene suggests novel roles for Lrp, cyclic AMP (cAMP) receptor protein-cAMP complex, and integration host factor in the stationary-phase response of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 7910-7917.
- Law, D. (1994) Adhesion and its role in virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **7**: 152-173.
- Levine, M.M. (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**: 377-389.
- Levine, M.M., Bergquist, E.J., Nalin, D.R., Waterman, D.H., Hornick, R.B., Young, C.R. and Sotman, S. (1978) *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* **1**: 1119-1122.
- Loewen, P.C. and Hengge-Aronis, R. (1994) The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu Rev Microbiol* **48**: 53-80.
- Lucht, J.M., Dersch, P., Kempf, B. and Bremer, E. (1994) Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 6578-6578.
- Makino, S., van Putten, J.P. and Meyer, T.F. (1991) Phase variation of the opacity outer membrane protein controls invasion by *Neisseria gonorrhoeae* into human epithelial cells. *Embo J* **10**: 1307-1315.
- Manjarrez-Hernandez, H.A., Baldwin, T.J., Aitken, A., Knutton, S. and Williams, P.H. (1992) Intestinal epithelial cell protein phosphorylation in enteropathogenic *Escherichia coli* diarrhoea. *Lancet* **339**: 521-523.
- Manjarrez-Hernandez, H.A., Baldwin, T.J., Williams, P.H., Haigh, R., Knutton, S. and Aitken, A. (1996) Phosphorylation of myosin light chain at distinct sites and its association with the cytoskeleton during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* **64**: 2368-2370.
- Martínez-Laguna, Y., Calva, E. and Puente, J.L. (1999) Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the

- transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**: 153-165.
- Maurelli, A.T. (1989) Temperature regulation of virulence genes in pathogenic bacteria: a general strategy for human pathogens? *Microb Pathog* **7**: 1-10.
- Mayer, M.P. (1995) A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**: 41-46.
- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S. and Kaper, J.B. (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1664-1668.
- McDaniel, T.K. and Kaper, J.B. (1997) A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* **23**: 399-407.
- McNamara, B.P. and Donnenberg, M.S. (1998) A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic *Escherichia coli* via the type III export pathway. *FEMS Microbiol Lett* **166**: 71-78.
- Mekalanos, J.J. (1992) Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* **174**: 1-7.
- Mellies, J.L., Elliott, S.J., Sperandio, V., Donnenberg, M.S. and Kaper, J.B. (1999) The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* **33**: 296-306.
- Nataro, J.P. and Kaper, J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.
- Nataro, J.P., Maher, K.O., Mackie, P. and Kaper, J.B. (1987) Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **55**: 2370-2377.
- Owen-Hughes, T.A., Pavitt, G.D., Santos, D.S., Sidebotham, J.M., Hulton, C.S., Hinton, J.C. and Higgins, C.F. (1992) The chromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression. *Cell* **71**: 255-265.

- Pérez, M. (2001) Estudio de la expresión del gen *ler* de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). *Departamento de Microbiología Molecular*, IBT. UNAM, Cuernavaca, Mor., p. 71.
- Philpott, D.J., Mckay, D.M., Sherman, P.M. and Perdue, M.H. (1996) Infection of T84 cells with enteropatogenic *Escherichia coli* alters barrier and transport functions. *Am J Physiol* **270**: G634-G645.
- Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W. and Schoolnik, G.K. (1996) The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* **20**: 87-100.
- Puente, J.L., Flores, V., Fernandez, M., Fuchs, Y. and Calva, E. (1987) Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene* **61**: 75-83.
- Ramer, S.W., Bieber, D. and G.K., S. (1996) BfpB, an outer membrane lipoprotein required for the biogenesis of bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 6555-6563.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blakeand, P.A. and Cohen., M.L. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**: 681-685.
- Robins-Browne, R.M. (1987) Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev Infect Dis* **9**: 28-53.
- Rosenshine, I., Ruschkowski, S., Stein, M., Reinscheid, D.J., Mills, S.D. and Finlay, B.B. (1996) A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO J* **15**: 2613-2624.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez-SanMartín, C., Bustamante, V., Calva, E. and Puente, J.L. (2001) Transcripcional regulation of the *orf19*, *tir* *cest* and *eae* genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181** en prensa.

- Sánchez-SanMartín, C., Sosa, M.G., Bustamante, V.H., Calva, E. and Puente, J.L. (1999) Transcriptional Organization and Regulation of the *orf19*, *tir*, *cest* and *eae* genes in Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *99th General Meeting of the American Society for Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., Chicago, Ill.
- Sanger, J.M., Chang, R., Ashton, F., Kaper, J.B. and Sanger, J.W. (1996) Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **34**: 279-287.
- Savkovic, S.D., Koutsouris, A. and Hecht, G. (1997) Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Am J Physiol* **273**: C1160-1167.
- Scaletsky, I.C., Silva, M.L. and Trabulsi, L.R. (1984) Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* **45**: 534-536.
- Skorupski, K. and Taylor, R.K. (1997) Control of the ToxR virulence regulon in *Vibrio cholerae* by environmental stimuli. *Mol Microbiol* **25**: 1003-1009.
- Sohel, I., Puente, J.L., Murray, W.J., Vuopio-Varkila, J. and Schoolnik, G.K. (1993) Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes. *Mol Microbiol* **7**: 563-575.
- Sohel, I., Puente, J.L., Ramer, S.W., Bieber, D., Wu, C.Y. and Schoolnik, G.K. (1996) Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J Bacteriol* **178**: 2613-2628.
- Sosa, M. (1999) Regulación transcripcional y traduccional del locus *bfpTVW* de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). *Microbiología Molecular*, IBT. UNAM, Cuernavaca, Morelos, p. 59.
- Sperandio, V., Mellies, J.L., Nguyen, W., Shin, S. and Kaper, J.B. (1999) Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15196-15201.

- Stein, M., Kenny, B., Stein, M.A. and Finlay, B.B. (1996) Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J Bacteriol* **178**: 6546-6554.
- 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.
- Taylor, K.A., Luther, P.W. and Donnenberg, M.S. (1999) Expression of the EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology. *Infect Immun* **67**: 120-125.
- Tobe, T., Hayashi, T., Han, C.G., Schoolnik, G.K., Ohtsubo, E. and Sasakawa, C. (1999a) Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. *Infect Immun* **67**: 5455-5462.
- Tobe, T., Schoolnik, G.K., Sohel, 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.
- Tobe, T., Tatsuno, I., Katayama, E., Wu, C.Y., Schoolnik, G.K. and Sasakawa, C. (1999b) A novel chromosomal locus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), which encodes a *bfpT*-regulated chaperone-like protein, TrcA, involved in microcolony formation by EPEC. *Mol Microbiol* **33**: 741-752.
- 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.
- Tupper, A.E., Owen-Hughes, T.A., Ussery, D.W., Santos, D.S., Ferguson, D.J., Sidebotham, J.M., Hinton, J.C. and Higgins, C.F. (1994) The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology in vitro. *EMBO J* **13**: 258-268.
- 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.
- Warawa, J., Finlay, B.B. and Kenny, B. (1999) Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**: 5538-5540.
- 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.
- Yamada, H., Yoshida, T., Tanaka, K., Sasakawa, C. and Mizuno, T. (1991) Molecular analysis of the *Escherichia coli hns* gene encoding a DNA-binding protein, which preferentially recognizes curved DNA sequences. *Mol Gen Genet* **230**: 332-336.
- Zuber, F., Kotlarz, D., Rimsky, S. and Buc, H. (1994) Modulated expression of promoters containing upstream curved DNA sequences by the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *Mol Microbiol* **12**: 231-240.

## **ANEXO I**

## Transcriptional Regulation of the *orf19* Gene and the *tir-cesT-eae* Operon of Enteropathogenic *Escherichia coli*

CLAUDIA SÁNCHEZ-SANMARTÍN, VÍCTOR H. BUSTAMANTE, EDMUNDO CALVA, AND JOSÉ LUIS PUENTE\*

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

Received 22 August 2000/Accepted 19 February 2001

To establish an intimate interaction with the host epithelial cell surface, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) produces Tir, a bacterial protein that upon translocation and insertion into the epithelial cell membrane constitutes the receptor for intimin. The *tir* gene is encoded by the locus for enterocyte effacement (LEE), where it is flanked upstream by *orf19* and downstream by the *cesT* and *eae* genes. With the use of a series of *cat* transcriptional fusions and primer extension analysis, we confirmed that *tir*, *cesT*, and *eae* form the *LEE5* operon, which is under the control of a promoter located upstream from *tir*, and found that the *orf19* gene is transcribed as a monocistronic unit. We also demonstrated that the LEE-encoded regulator Ler was required for efficient activation of both the *tir* and the *orf19* promoters and that a sequence motif located between positions  $-204$  and  $-157$  was needed for the Ler-dependent activation of the *tir* operon. Sequence elements located between positions  $-204$  and  $-97$  were determined to be required for the differential negative modulatory effects exerted by unknown regulatory factors under specific growth conditions. Upon deletion of the upstream sequences, the *tir* promoter was fully active even in the absence of Ler, indicating that *tir* expression is subject to a repression mechanism that is counteracted by this regulatory protein. However, its full activation was still repressed by growth in rich medium or at  $25^{\circ}\text{C}$ , suggesting that negative regulation also occurs at or downstream of the promoter. Expression of *orf19*, but not of the *tir* operon, became Ler independent in an *hns* mutant strain, suggesting that Ler overcomes the repression exerted by H-NS (histone-like nucleoid structuring protein) on this gene.

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a major cause of acute and persistent infantile diarrhea and a leading cause of infant death in developing countries (35, 43, 45). The interaction of EPEC with the host cell, which has been the subject of several recent reports, has been divided into three different stages characterized by two distinctive phenotypes, localized adherence and the attaching-and-effacing (A/E) lesion (reviewed in references 9, 11, 18, and 43). The virulence determinants required for the induction of the A/E lesion in EPEC are encoded in a 35.6-kb pathogenicity island, denoted LEE (for locus of enterocyte effacement), which contains 41 predicted open reading frames (16, 38, 39). Based on recent studies and sequence analyses, most of the LEE-encoded genes have been divided into three functional regions: the *esc* and *sep* genes, which code for a type III secretion-translocation apparatus (25); the *tir*, *cesT*, and *eae* genes, coding for the proteins involved in intimate attachment (1, 14, 26, 28); and the *esp* genes, which encode effector proteins that are involved in the formation of a translocon for delivering effector molecules to the host cell (17, 29, 30, 32, 33, 51).

Recent studies have indicated that the LEE-encoded genes are organized into five major operons (14, 41): the *LEE1*, *LEE2*, and *LEE3* operons, which contain the *esc* and *sep* genes; the *LEE4* operon, which encodes secreted Esp proteins; and the *tir*, *cesT*, and *eae* cluster, herein denoted *LEE5*. Ler acts as

a positive transcriptional regulator of the *LEE2*, *LEE3*, *LEE4*, and *LEE5* operons (5, 19, 41). Furthermore, integration host factor (IHF) (19) and a quorum-sensing autoinducer (LuxS) (47) are also required for efficient activation of the LEE-encoded genes. In addition, it has been proposed that Ler overcomes the negative regulation exerted by H-NS (histone-like nucleoid structuring protein) on the expression of at least the *LEE2*, *LEE3*, and *LEE4* operons (5).

We studied the transcriptional organization and regulation of the *orf19*, *tir*, *cesT*, and *eae* genes of EPEC. The *tir* gene codes for Tir (translocated intimin receptor), which is transferred by the type III secretion system into host cells, where it is phosphorylated and inserted into the host cell membrane (28). Tir is the receptor for intimin, an *eae*-encoded outer membrane protein necessary for intimate attachment to epithelial cells (26). *cesT*, previously known as *orfU*, codes for a chaperone that is required for the stable secretion of Tir (1, 14). The *orf19* gene encodes a protein that exhibits similarity to IpgB of *Shigella flexneri* (16) and to TrcA and TrcP of EPEC (48, 50). In the present study we have demonstrated that *tir*, *cesT*, and *eae* constitute an operon and that *orf19* is a monocistronic unit. We show that transcription of the *tir* operon and the *orf19* gene requires Ler, which seems to overcome the negative regulation exerted by a repressor protein that is also present in *E. coli* K-12. In addition, we show that distinct *cis*-acting elements are involved in negative and positive regulation of *tir* expression by different regulatory elements and environmental cues.

(A preliminary account of this work was presented at the 99th General Meeting of the American Society for Microbiology, Chicago, Ill., 30 May to 3 June 1999 [C. Sanchez-SanMartín,

\* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62251, México. Phone: (52) 73 291 621. Fax: (52) 73 138 673. E-mail: puente@ibt.unam.mx.



TABLE 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description	Reference or source
<b>Strains</b>		
E2348/69	Wild-type EPEC O127:H6	36
JPN15	E2348/69 lacking the EAF plasmid	26
E2348/69 $\Delta$ ler	E2348/69; $\Delta$ ler mutant	5
B171-8	Wild-type EPEC O111:NM	44
B171-10	B171-8 lacking the EAF plasmid	4
MC4100	F <sup>-</sup> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> ) <i>U169 prsL150 relA1 deoC1 rbsR fthD5301 fruA25</i> $\lambda$ <sup>-</sup>	7
RO64	MC4100 <i>lrp-201::Tn10</i>	34
MCG007	MC4100 <i>rpoS::Tn10</i>	C. Gómez
MCG009	MC4100 <i>fis::kan</i>	C. Gómez
GS480 $\Delta$ 900	MC4100 <i>malP::neo</i> $\Delta$ ( <i>envZ-malP</i> )900	20
CSH56	$\Delta$ <i>lac-pro supD nalA thi</i>	52
CSH56 $\Delta$ hns	CSH56 carrying a deletion of <i>hns</i>	52
N99	F <sup>-</sup> <i>galK2 rpsL</i> $\lambda$ <sup>-</sup>	22
K5185	N99 $\Delta$ <i>himA82</i>	42
ET8000	<i>rbs gyrA hutC<sub>x</sub> lacZ::IS1 Mu cts62</i>	23
ET8045	ET8000 <i>rpoN208::Tn10</i>	8
SM796	F <sup>-</sup> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>araABC-leu</i> )7697 <i>galE galK</i> $\Delta$ ( <i>lac</i> ) X74 <i>rpsL thi phoA</i> $\Delta$ Pvull <i>phpR</i>	6
SBC796	SM796 <i>fur::Tn5</i>	6
<b>Plasmids</b>		
pKK232-8	pBR322 derivative containing a promoterless <i>cat</i> gene	3
pCAT232	pKK232-8 derivative containing a <i>bfpA-cat</i> transcriptional fusion from nt -232 to +36	44
pKORF1	pMPPM-K3 derivative carrying the <i>ter</i> gene expressed under the control of the <i>tac</i> promoter	5
pCS-TVW	pMPPM-K3 derivative carrying the <i>per</i> ( <i>bfpTVW</i> ) locus expressed under the control of the <i>tac</i> promoter	Sánchez-SanMartín et al. (unpublished)
pORF19	pKK232-8 derivative containing the <i>orf19-cat</i> transcriptional fusion from nt -175 to +166	This study
pTIR394	<i>tir-cat</i> transcriptional fusion from nt -394 to +138	This study
pTIR243	<i>tir-cat</i> transcriptional fusion from nt -243 to +138	This study
pTIR204	<i>tir-cat</i> transcriptional fusion from nt -204 to +138	This study
pTIR157	<i>tir-cat</i> transcriptional fusion from nt -157 to +138	This study
pTIR122	<i>tir-cat</i> transcriptional fusion from nt -122 to +138	This study
pTIR97	<i>tir-cat</i> transcriptional fusion from nt -97 to +138	This study
pTIR80	<i>tir-cat</i> transcriptional fusion from nt -80 to +138	This study
pTIR45	<i>tir-cat</i> transcriptional fusion from nt -45 to +138	This study
pTIR22	<i>tir-cat</i> transcriptional fusion from nt -22 to +138	This study
pTIREAE	<i>tir-cat</i> transcriptional fusion from nt -294 of <i>tir</i> to the fourth codon of <i>eae</i>	This study
pTIR-EAE-DEL1	<i>tir-cat</i> transcriptional fusion from nt -294 of <i>tir</i> to the 15th codon of <i>cesT</i>	This study
pTIRCAM-10	pTIR-EAE derivative in which the -10 promoter hexamer sequence of <i>tir</i> was replaced by a <i>SacI</i> recognition sequence	This study
pTIRCAM-10-DEL1	pTIRCAM-10 derivative from which the <i>cesT-eae</i> intergenic region was deleted	This study
pCEST	<i>cesT-cat</i> transcriptional fusion containing the intergenic region between <i>tir</i> and <i>cesT</i>	This study
pEAE1800	<i>eae-cat</i> transcriptional fusion containing 1,800 bp upstream from the <i>eae</i> start codon	This study
pEAE1629	<i>eae-cat</i> transcriptional fusion containing 1,629 bp upstream from the <i>eae</i> start codon	This study
pCEST-EXT-EAE	pCEST derivative, equivalent to pEAE1629	This study
pEAE1422	<i>eae-cat</i> transcriptional fusion containing 1,422 bp upstream from the <i>eae</i> start codon	This study
pEAE532	<i>eae-cat</i> transcriptional fusion containing 532 bp upstream from the <i>eae</i> start codon	This study

M. G. Sosa, V. H. Bustamante, E. Calva, and J. L. Puente, Abstr. 99th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol., abstr. B/D-227, p. 74, 1999.]

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and growth conditions.** Strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Overnight cultures were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth medium (46). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 0.45% (wt/vol) glucose and L-glutamine (584 mg/l) without sodium pyruvate (Gibco Life Technologies) and supplemented with pyridoxal (4  $\mu$ g/ml) was used for growth at 37°C. Where indicated, 20 mM ammonium sulfate was added. An overnight LB culture was pelleted, and the bacteria were resuspended in phosphate-buffered saline, pH 7.4, to an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 1. Fifty milliliters of DMEM or LB was inoculated with 1 ml of the bacterial phosphate-buffered saline suspension and incubated in an orbital shaker water bath (Amerex Instruments) at 200 rpm and various temperatures. When necessary, antibiotics were added at the following concentrations: ampicillin, 100  $\mu$ g/ml; nalidixic acid, 15  $\mu$ g/ml; kanamycin, 40  $\mu$ g/ml; chloramphenicol, 50  $\mu$ g/ml; gentamicin, 15  $\mu$ g/ml; and tetracycline, 25  $\mu$ g/ml. Samples were collected every hour, or when the cultures reached OD<sub>600</sub> of 0.8, 1.0, 1.2, and 1.4, to determine chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity or for RNA extraction.

**Molecular biology techniques.** DNA manipulations were performed according to standard protocols (46). Restriction and DNA-modifying enzymes were obtained from Boehringer Mannheim, New England Biolabs, or Gibco BRL and used according to the manufacturer's instructions. [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3,000 Ci mmol<sup>-1</sup>) was purchased from Amersham Corp. Oligonucleotides were purchased from BioSynthesis or provided by the Oligonucleotide Synthesis Facility at our institute. PCRs were performed in 100- or 50- $\mu$ l volumes, with AmpliTaq (Perkin-Elmer) being used according to the manufacturer's instructions. Double-stranded DNA sequencing of the plasmids generated in this work was carried out by the dideoxy-chain termination procedure with a Thermo Sequenase cycle sequencing kit according to the manufacturer's (Amersham) instructions.

**Construction of *cat* transcriptional fusions.** PCR fragments of different lengths that spanned the region between *orf19* and *eae* were amplified using as a

TABLE 2. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')
CAM10TIR2R	.....ACCAGAGCTCTCACAGTATAATTTTGTG
CAM10TIR1F	.....GTGAGAGCTCTGGTTTATGCTCAGTTTG
EAE1669REG	.....GGGATAAAAAAGCTTGAGTA
EAEREG06	.....GTTGCTCAGATCCAAATTTCTG
EAEREG1052L	.....CAACGTTGCAGCATGGGTAAC
ORFU-H3R	.....CCAACACCAATTTTTTCCGC
ORF19-H3R	.....CCGCCTAAGCTTACGCTCTAC
RORF10-H3R	.....TGTTATCCCAAGCTTATGT
TIR-H3R	.....CTGTTTGTGAAGCTTGTGGC
TIR22F-E23	.....CATCAAAAAGGATCCTGTGATTTATTG
TIR45F-E23	.....CATTCTGGATCCTTATTTTGC
TIR80F-E23	.....GATTTTGATTATGGGATCCTTTA
TIR97F-E23	.....GATAATTATAGGATCCTTTTGATTATG
TIR122F-E23	.....CATATAAAAATTAGGATCCTTTTTTTTC
TIR157F-E23	.....ATATTATTTTGGATCCACAATTAATTTTC
TIR204F-E23	.....TTTTCTGGATCCAAAAAGGTCTC
TIR243F-E23	.....GATACTCGGATCCAGGGGAAAC
16S	.....CACAGATTGTCTGATAAATTG

template chromosomal DNA from wild-type EPEC strain E2348/69. The forward and reverse oligonucleotides were designed to introduce *Bam*HI or *Hind*III restriction sites, respectively (Table 2). The PCR-amplified fragments were digested with *Bam*HI and *Hind*III and cloned into pKK232-8, a vector, digested with the same enzymes, containing a promoterless CAT gene (*cat*) (Pharmacia LKB Biotechnology). Each ligation reaction product was electroporated into *E. coli* MC4100, after which ampicillin-resistant colonies were selected. The resulting plasmids (Table 1) were sequenced to confirm the fidelity of the PCR amplification and introduced into different strains by electroporation, using a Gene Pulser apparatus (Bio-Rad) at settings of 2.5 kV, 25  $\mu$ F, and 200  $\Omega$ , or by  $\text{CaCl}_2$  transformation according to standard protocols (46).

**Mutagenesis of the -10 promoter sequence.** Oligonucleotide CAM10tirR plus pKKampi and oligonucleotide CAM10tirF plus pKKcat (Table 2) were used to amplify two fragments encompassing the *tir* regulatory region contained in pTIREAE. Oligonucleotides CAM10tirR and -F introduce a *Sac*I restriction site that replaces the -10 promoter hexamer. Both fragments were digested with *Sac*I and with either *Bam*HI (left fragment) or *Hind*III (right fragment) and cloned into pKK232-8 digested with *Bam*HI and *Hind*III, creating pTIRCAM-10. The insert in this plasmid was sequenced to verify that only the -10 hexamer sequence was modified.

**RNA isolation and primer extension analysis.** Total bacterial RNA from samples obtained from DMEM or LB cultures was isolated using a commercial kit (RNeasy [Qiagen] or Boehringer Mannheim High Pure RNA isolation kit). End-labeled oligonucleotides complementary to the 5' end of the *cat* structural gene or the *tir*, *cesT*, *eae*, or *orf19* structural gene were used for primer extension reactions as previously described (5, 37). The extended products were purified with a Microcon-10 microconcentrator (Amicon) and analyzed by electrophoresis in 8% polyacrylamide-urea gels. Primer extension using a 16S rRNA-specific oligonucleotide was included as a control to monitor RNA quality and loading concentration. Sequence ladders were generated with the same primers and DNA of the different pKK232-8 derivatives or plasmids carrying the genes being studied in this work.

**CAT assay.** The CAT assay was performed as described previously (5, 37, 44).

## RESULTS

**Transcriptional organization of the *orf19*, *tir*, *cesT*, and *eae* genes.** The start codon of *tir* is located 326 bp downstream from the stop codon of *orf19*, while the *tir-cesT* and *cesT-eae* intergenic regions consist of 137 and 63 bp, respectively (Fig. 1). To confirm and further analyze the transcriptional organization of the *orf19*, *tir*, *cesT*, and *eae* genes and to identify intergenic regions with promoter activity, a series of transcriptional fusions to the *cat* reporter gene was constructed (Fig. 1). These plasmids were transformed into EPEC wild-type strains E2348/69 and B171-8, and CAT activity directed by each fusion

was determined from samples collected from cultures grown in DMEM at 37°C, conditions that induce expression of different virulence factors in EPEC (5, 27, 37, 44). The fusions carried by plasmids pTIR394, pTIREAE, and pTIREAE-DEL1, which all contain the 5' upstream region of *tir*, expressed significant levels of CAT (Fig. 1). In contrast, fusions pEAE1800, pEAE1629, pEAE1422, and pEAE520, which contain different lengths of the region upstream from the *eae* start codon but lack the *tir* promoter region, expressed only background levels of CAT activity (Fig. 1 and data not shown). These results confirmed that *tir*, *cesT*, and *eae* constitute an operon that is expressed under the control of a promoter located upstream of *tir* and indicated that *eae* does not have an independent promoter.

To confirm that the *eae* gene is transcribed from the *tir* promoter, the putative -10 hexamer (see below) was replaced by the CTCGAG sequence in pTIREAE, as described in Materials and Methods, generating pTIRCAM-10. As expected, this fusion did not express CAT (Fig. 1). Fusion plasmid pORF19, which contains 308 bp upstream from the translational start codon of *orf19*, was active (Fig. 1), indicating that this gene is transcribed from its own promoter.

A fusion containing just the *tir-cesT* intergenic region (pCEST) rendered activity levels that suggested the existence of an additional active promoter for the *cesT* gene (Fig. 1). However, fusions pEAE1800, pEAE1629, and pEAE1422, containing the *tir-cesT* and *cesT-eae* intergenic regions, were inactive (Fig. 1), suggesting a role for the *cesT-eae* intergenic region in terminating transcription originating at the *cesT* putative promoter. To further analyze this possibility, the *cesT-eae* intergenic region was cloned into pCEST to generate plasmid pCEST-EXT-EAE (see Materials and Methods). In this case, no activity was detected (data not shown). When this region was deleted from the inactive fusions carried by plasmids pEAE1629 and pTIRCAM-10, thus recreating the pCEST fusion and generating pTIRCAM-10-DEL1 (which lacks a functional *tir* promoter), respectively, the *cesT* transcriptional activity was recovered (Fig. 1).

Two transcriptional start sites were identified for the putative *cesT* promoter when primer extension experiments were performed with total RNA of EPEC E2348/69 carrying either pCEST, pEAE1629, or pTIRCAM-10 fusions (Fig. 2C). These results confirmed the existence of active *cesT* promoters in these fusions and suggested that the *eae* upstream region contains elements involved in terminating transcription originating from the *cesT* promoter.

**Determination of the transcriptional start sites of the *orf19* and *tir* genes.** The potential transcriptional activity from the 5' upstream regions of the four genes considered for this study was tested by primer extension analysis (Fig. 2 and data not shown). A transcriptional start site corresponding to a T residue was located 85 bp upstream from the translational start codon of *tir* (Fig. 2A), one base further downstream from where it was previously mapped (14).

Examination of the 5' upstream region revealed the presence of putative -35 (TTGCAT) and -10 (TTTATT) promoter sequences (Fig. 3A). When the putative -10 promoter sequence was replaced by the CTCGAG sequence, fusions carrying this mutation became inactive (Fig. 1), indicating that this sequence motif was essential for transcriptional activation of the *tir* operon. An additional transcriptional start site for *tir*,

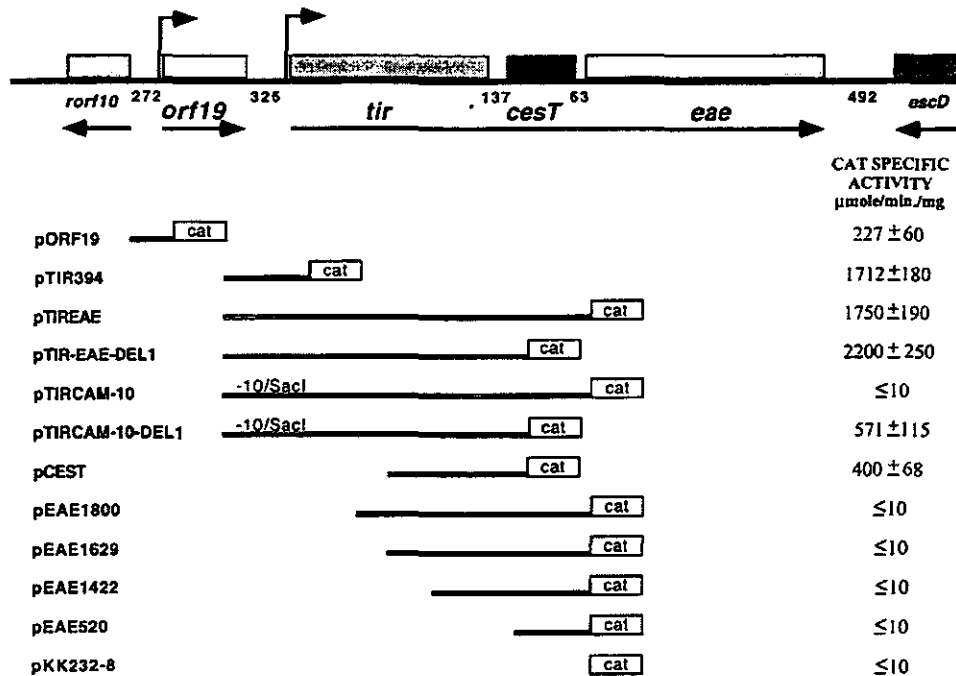


FIG. 1. *tir*, *cesT*, and *eae* constitute an operon. (A) Schematic representation of the organization of the *orf19*, *tir*, *cesT*, and *eae* genes and of the transcriptional fusions constructed to study their regulation. The horizontal arrows indicate the direction of transcription. Bent-tailed arrows denote the transcriptional start sites identified in this work (see the text). The sizes (in base pairs) of the intergenic regions are shown below the thick horizontal line. Plasmid denominations are indicated in the left-hand column below. The fragments cloned into the promoterless *cat* gene vector pKK232-8 are denoted by solid lines, and the *cat* gene is indicated by an open box at the end of each fragment. The -10/SacI label indicates the presence of a mutation that replaced the putative *tir* -10 promoter hexamer by a *SacI* restriction site. The right-hand column shows the CAT activity expressed by each fusion in EPEC E2348/69 grown in DMEM at 37°C. The data obtained for EPEC B171-8 are not shown, for simplicity, but rendered the same conclusions. The CAT specific activity was determined from cells harvested at an OD<sub>600</sub> of 1.4. The results reported are the averages ± standard deviations of data from at least four different experiments.

corresponding to a T residue, was identified 24 bp upstream from the first reported site (Fig. 2A); however, the relevance of this weaker potential promoter is unknown. A transcriptional start site was also identified for *orf19*, on an A residue located 133 bp upstream from its translational start codon (Fig. 2B). Analysis of its 5' upstream region revealed the presence of putative -35 (TTGCAT) and -10 (ATAAAT) promoter sequences (Fig. 3B). In contrast, no transcriptional start site was observed for the chromosomal *cesT* and *eae* genes under the conditions tested.

**Ler is required for transcriptional activation of *tir* and *orf19*.** As described above, *tir*-*cat* fusions were active in two different EPEC wild-type strains (Fig. 1). However, when plasmid pTIR394, carrying the *tir*-*cat* fusion, was transformed into *E. coli* MC4100 (a K-12 derivative laboratory strain), its transcriptional activity was reduced (Fig. 4A), indicating that full expression of the *tir* operon required a regulatory factor that was present only in wild-type EPEC. To identify the activator(s) involved in *tir* expression, we first examined the potential role of the EAF plasmid by transforming pTIR394 into EPEC strains JPN15 and B171-10 (pEAF-minus derivatives of EPEC wild-type strains E2348/69 and B171-8, respectively) (Table 1). Expression of the *tir*-*cat* fusion in the plasmid-cured strains rendered levels of CAT activity similar to those obtained in the

wild-type strains (Fig. 4A and data not shown), indicating that the transcriptional activation of *tir* was independent of the EAF plasmid. This observation was confirmed by determining that the transcriptional activities of the chromosomal *tir* promoters of wild-type EPEC and its pEAF-minus derivative were similar when compared by primer extension (Fig. 2A, lanes 1 and 2).

It has been shown that the product of the *ler* gene (previously known as *orf1*) is a positive regulator of the expression of *sepZ* and *orf12*, two genes also located in the LEE (5, 41). This observation prompted us to investigate the role of *Ler* in *tir* expression by performing primer extension experiments with total RNA obtained from DMEM cultures of an EPEC  $\Delta$ *ler* strain which carries an in-frame deletion of *ler* (5). Expression of *tir* was considerably reduced in this mutant, while complementation with *ler* on a plasmid restored its expression (Fig. 2A, lanes 3 and 4). In agreement with these results, the activity directed by the *tir*-*cat* fusion (pTIR394) was reduced about 10-fold in the  $\Delta$ *ler* mutant strain, while its activation was restored and enhanced by supplementing *ler* in *trans* with plasmid pKORF1 (Fig. 4A). Furthermore, activation was restored in *E. coli* MC4100 when supplemented with pKORF1, but not with a plasmid carrying the entire *per* locus (pCS-TVW), which, in

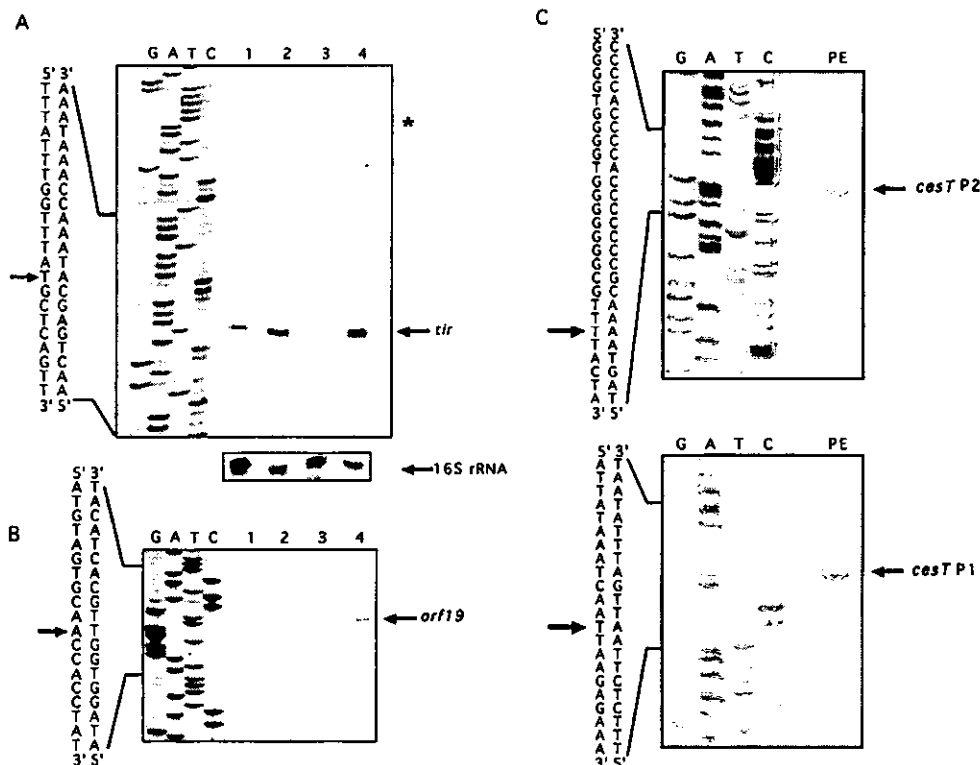


FIG. 2. Primer extension analysis of the *tir*, *orf19*, and *cesT* promoter regions. (A) Total RNA was obtained from culture samples of strains EPEC E2348/69 wild type (lane 1), JPN15 (pEAF cured) (lane 2), EPEC E2348/69 $\Delta$ ler (lane 3), and EPEC E2348/69 $\Delta$ ler carrying pKORF1 (lane 4) growing in DMEM at 37°C (OD<sub>600</sub> = 0.8). A primer specific for the *tir* structural gene was used, and primer extension was performed as described in Materials and Methods. A primer extension assay using a primer specific for the 16S rRNA gene was performed as a control. (B) Primer extension analysis was performed as described for panel A but with a primer specific for the *orf19* structural gene. (C) Total RNA from EPEC E2348/69 carrying pCEST (*cesT-cat* fusion) and a *cat*-specific primer were used for primer extension reactions. The upper and bottom panels show the two extended products. Lanes G, A, T, and C correspond to the DNA sequence ladder obtained with the corresponding primer. The sequences spanning the transcription start site are shown, and the transcription start sites (in bold) are marked with arrows.

contrast, complemented the expression of the *bfpA-cat* fusion that was used as a control (Fig. 4A).

Consistent with these results, primer extension analysis revealed that Ler-dependent activation of the *tir-cat* fusion in pTIR394 was directed by the same putative promoter predicted for the wild-type gene (Fig. 4B). Similar experiments, using the same set of strains carrying the pORF19 fusion, revealed that *orf19* expression also required a functional *ler* gene (Fig. 2B; see also Fig. 7A). Taken together, these results indicated that Ler was required for the positive regulation of *tir* and *orf19* expression.

**Analysis of the *tir* promoter region.** To define the minimal regulatory sequence required for *tir* expression, a series of fusions containing segments of the *tir* 5' promoter region ranging from 394 to 22 bp in length, with respect to the transcriptional start site (Fig. 3 and 5), was constructed. Fusions containing sequences up to position -204 (pTIR204) or longer were found to express similar amounts of CAT in EPEC E2348/69 (Fig. 5A). However, fusions to position -157 (pTIR157) or -122 (pTIR122) showed a significant reduction of CAT activity compared with that obtained with pTIR394 (Fig. 5A). Fusions containing up to position -97, -80, or -45

(pTIR97, pTIR80, and pTIR45, respectively) expressed a two-fold increase in CAT activity in comparison to that obtained with pTIR394 (Fig. 5A). As expected, a fusion containing up to position -22 which lacks the putative -35 promoter hexamer did not express CAT.

In the absence of Ler (in EPEC  $\Delta$ ler or *E. coli* MC4100), *tir-cat* fusions in pTIR394, pTIR243, and pTIR204 showed only background levels of *tir* promoter activity (Fig. 5A). In the absence of sequence elements located between positions -157 and -97, activation of the *tir* promoter became Ler independent (Fig. 5A). These results suggested that Ler could interact with a DNA sequence motif located between positions -204 and -157 and that this interaction overcame the repressing effect exerted by a negative regulatory factor, also present in *E. coli* K-12, that interacts with sequence elements located between positions -157 and -97. To rule out the possibility that an additional promoter was responsible for the Ler-independent activity shown by the shorter fusions, primer extension experiments were performed with total RNA obtained from culture samples of strains EPEC E2348/69, EPEC  $\Delta$ ler, and *E. coli* MC4100 carrying fusions pTIR204, pTIR157, pTIR97, or pTIR45. The resulting primer extension products demon-



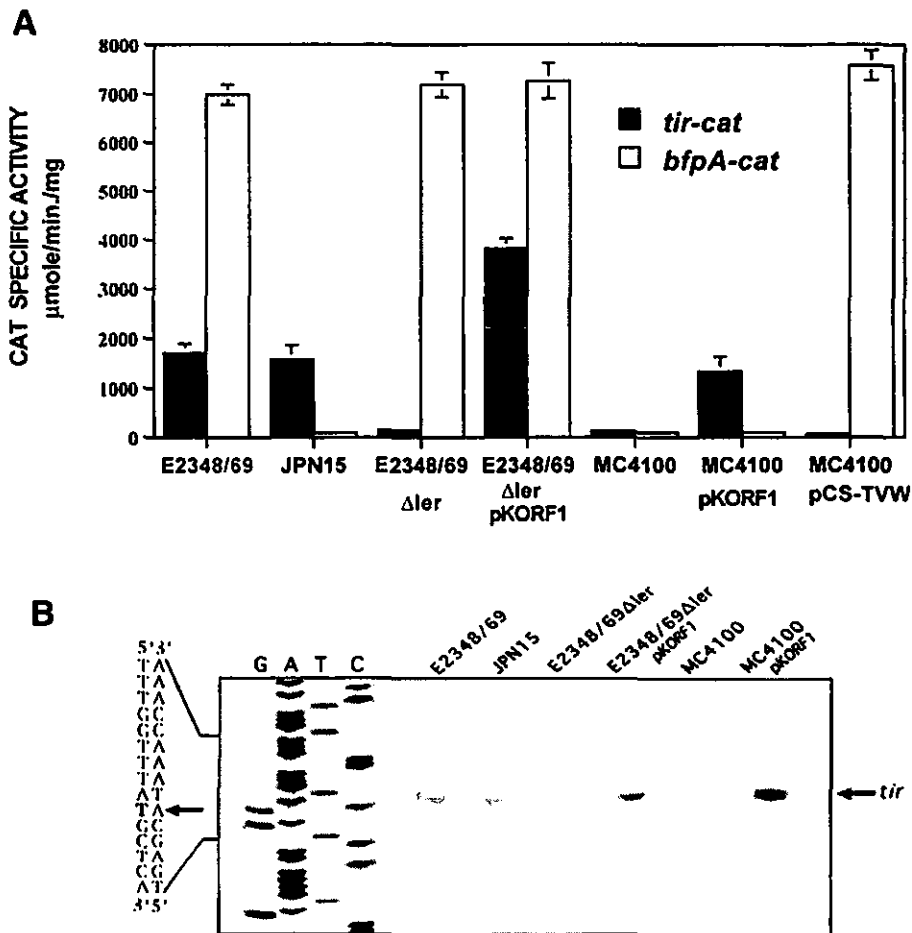


FIG. 4. Expression of *tir* requires the Ler protein. (A) The transcriptional activity directed by the *tir-cat* fusion in pTIR394 and the *bfpA-cat* fusion contained in pCAT232 was tested in EPEC strains E2348/69 (wild type), JPN15 (an EAF-minus derivative), and Δ*ler* (a *ler* in-frame deletion mutant of E2348/69) carrying or not carrying pKORF1 (*ler*<sup>+</sup>), as well as in *E. coli* K-12 strain MC4100 (wild type) carrying or not carrying either pKORF1 (*ler*<sup>+</sup>) or pCS-TVW (*per/bfpTVW*<sup>+</sup>). The CAT specific activity was determined from cells grown in DMEM at 37°C and harvested at an OD<sub>600</sub> of 1.4. The data are the averages of results from at least three different experiments. Error bars indicate standard deviations. (B) Primer extension analysis of the *tir-cat* fusion in pTIR394 was carried out with total RNA extracted from samples obtained at an OD<sub>600</sub> of 0.8 from the cultures described above. The primer extension reactions were performed as described in the legend to Fig. 2, using a primer specific for *cat*. The arrow on the left indicates the transcriptional start site of *tir-cat*.

scriptional start site located inside the structural *cesT* gene was previously proposed (21). However, neither fusions carrying different fragments of the *eae* upstream region (pEAE1800, pEAE1629, pEAE1422, and pEAE520) nor a *tir-eae-cat* fusion (pTIRCAM-10) carrying a mutation in the -10 *tir* promoter sequence demonstrated promoter activity (Fig. 1). Different attempts to define a transcriptional start site for *eae* by primer extension rendered only a variable ladder of undefined reverse transcription products (data not shown). We cannot rule out the possibility that additional promoters allow the differential expression of the components of the *LEE5* operon under different conditions. However, our initial data suggest that the observed *eae* primer extension products could be the result of posttranscriptional mRNA processing events.

A transcriptional start site for *cesT* has been reported (14).

Consistent with this observation, *cesT-cat* fusions carrying sequences of the upstream region of *cesT* without the *tir* promoter (pCEST and pTIRCAM-10-DEL1) directed the expression of significant levels of CAT activity (Fig. 1). Primer extension experiments with the *cat*-specific primer revealed two different transcriptional start sites (Fig. 2C). The first transcriptional start site was located 15 nt upstream of the *cesT* start codon and allowed the prediction of a good putative -10 (TATTAT) promoter sequence and a poor -35 (TGGGTA) hexamer. The sequence preceding the second start site did not show any homology with known promoter sequences (Fig. 3C). Because of its weak activity, we were unable to detect primer extension products derived from the transcript of the chromosomal *cesT* gene. This Ler-independent promoter activity does not seem to read through the *eae* gene, since the presence of

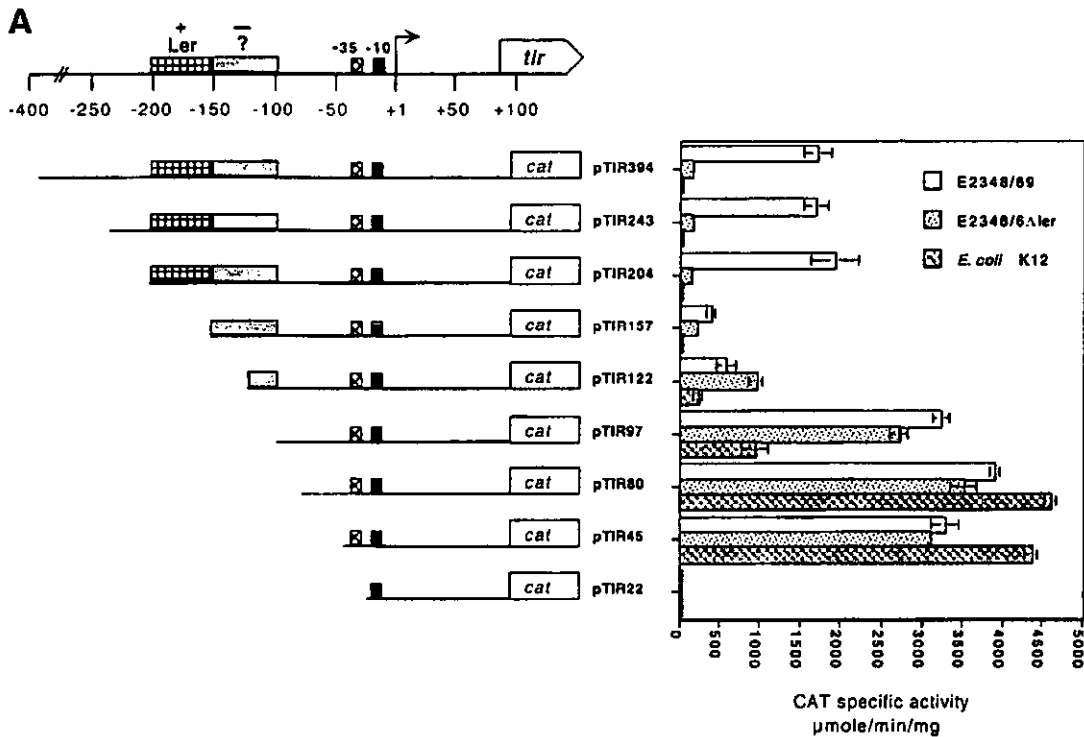


FIG. 5. *cis*-acting elements involved in *tir* expression. (A) Schematic representation of the *tir* regulatory region and *tir-cat* fusions. Numbering is relative to the transcription start site, which is indicated by a bent-tailed arrow. Regions containing sequences potentially involved in Ler-dependent activation (subdivided boxes) or in negative regulation (shaded boxes) are indicated. EPEC strains E2348/69 and E2348/69 $\Delta$ Ler, as well as *E. coli* MC4100, were transformed with different *tir-cat* fusions contained in plasmids pTIR394, pTIR243, pTIR204, pTIR157, pTIR122, pTIR97, pTIR80, pTIR45, and pTIR22. The resulting strains were grown in DMEM at 37°C, and the CAT specific activity was determined from samples obtained at an OD<sub>600</sub> of 1.4. The plots of the activities determined from samples obtained along the growth curve at other OD<sub>600</sub> values showed the same pattern. Values are the averages of data from at least three different experiments; error bars indicate standard deviations. (B) Total RNA was obtained from EPEC E2348/69 carrying the *tir-cat* fusions in pTIR204, pTIR157, pTIR80, and pTIR45, and primer extension assays were performed as described in the legend to Fig. 2. The arrow on the left indicates the transcriptional start site of the *tir-cat* fusions, which corresponds to that identified for the wild-type gene.

the *cesT-eae* intergenic region rendered fusions inactive (compare pTIRCAM-10 with pTIRCAM-10-DEL1 and pEAE1422 with pCEST [Fig. 1]). These results suggest that P<sub>*tir*</sub>-initiated transcription may be antiterminated while P<sub>*cesT*</sub>-initiated transcription is not. Further detailed analysis is required to establish the significance of these observations; however, it is tempting to speculate that the independent expression of *cesT* may ensure the presence of the chaperone when Tir is translated or that CesT has additional, as-yet-undefined functions.

Two major mechanisms regulate virulence gene expression in EPEC (5, 15, 19, 21, 41, 49). One involves a classical activator (PerA/BfpT) that is fully required for the activation of the *bfpA* and *perA* (*bfpT*) promoters (37, 49). *per* is also proposed to be involved in the modulation of *eae* expression (21), protein secretion (27), the down-regulation of intimin during

A/E adhesion (31), and the direct activation of the *LEE1* operon, which encodes the *ler* gene (41). The other involves an antagonist protein (Ler) (19, 41, 47) that is required to overcome the repression exerted by negative regulators on the expression of several LEE-encoded genes, which is directed by promoters that in the absence of upstream regulatory elements are constitutively expressed (5). Ler seems to act as a master key which modulates the expression of different virulence factors that allow the intimate colonization of the proximal small intestine and the generation of A/E lesions by EPEC. Based on these observations, we analyzed the role of the *ler* and *per* (*bfpTVW*)-encoded products in *LEE5* and *orf19* expression.

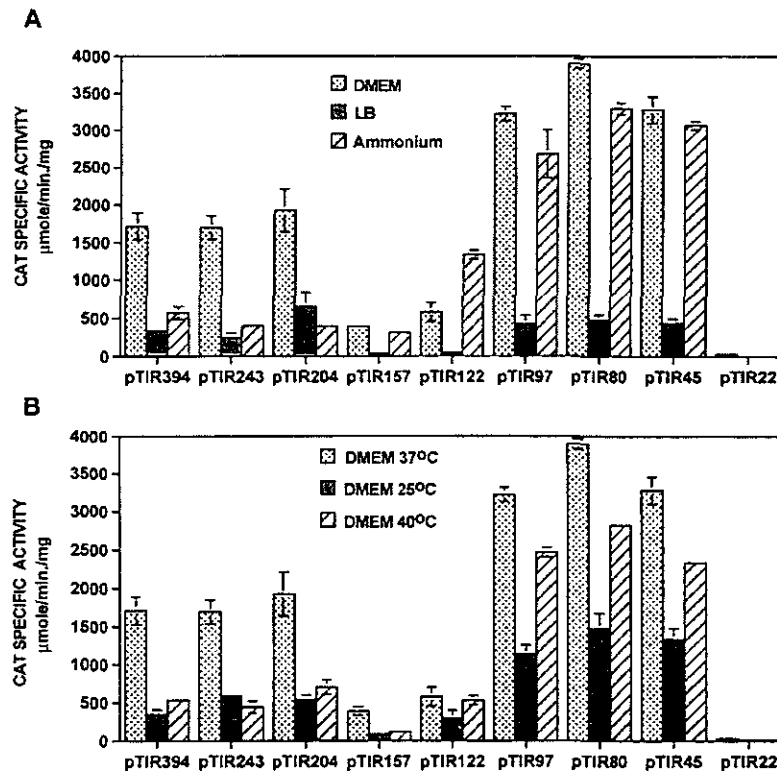


FIG. 6. Effect of the growth medium, the presence of ammonium, and temperature on *tir* expression. EPEC E2348/69 derivatives carrying the *tir-cat* fusions described in the legend to Fig. 5 were grown at 37°C in DMEM, DMEM plus 20 mM ammonium sulfate, or LB (A) or in DMEM at 37, 25, or 40°C (B). CAT specific activities from samples obtained at an  $OD_{600}$  of 1.4 were determined and plotted. The plots of the activities determined from samples obtained along the growth curve at other  $OD_{600}$  values showed the same pattern. Values are the averages of data from at least three different experiments; error bars indicate standard deviations.

Ler was needed for the efficient expression of both the *LEE5* operon and the *orf19* gene (Fig. 2 and 4 and data not shown). In contrast, wild-type EPEC, its EAF-cured derivative, and a *per* mutant strain did not show significant differences in their expression (Fig. 2 and 4 and data not shown). Hence, the *LEE5* operon and the *orf19* gene are part of the Ler regulon.

Deletion analysis of the *LEE5* upstream regulatory region indicated that nucleotides up to position -45, which include only the *tir* promoter, were sufficient for maximal activation even in the absence of Ler (Fig. 5). Full activation was maintained with sequences up to position -97, but not with sequences up to position -122 or -157, which sustained low levels of activation. This suggested that a sequence motif involved in negative regulation is located upstream of position -97 and that the negative regulator was conserved in non-pathogenic *E. coli* strains. Fusions up to position -204 or longer were activated in a Ler-dependent manner but only reached intermediate levels of activity with respect to those directed by the shorter fusions (Fig. 5). This established that sequences between positions -204 and -157 were necessary for Ler-dependent activation of the *LEE5* promoter, which was still modulated by a putative negative regulator that probably interacts with the region between positions -157 and -97.

Ler shows amino acid similarity to the DNA-binding global

transcriptional regulator H-NS and its paralogue, StpA (12, 16, 41). The H-NS protein has been implicated in the negative regulation of several virulence factors and housekeeping genes (2). Considering its similarity to H-NS, it is likely that Ler binds DNA sequences between positions -204 and -157. The H-NS protein is involved in the negative regulation of the *LEE2* and *LEE3* operons (5) and the *orf19* gene but not *LEE5* expression (see Results). Ler might overcome the repression exerted by H-NS or an unknown factor by directly or indirectly (e.g., changing the DNA topology) interfering with its binding. However, further work is required to distinguish between these and other possibilities.

Environmental conditions regulate the expression of several virulence factors in different bacteria, such as *Vibrio cholerae*, *Shigella* spp., *Yersinia* spp., and pathogenic *E. coli* strains (10, 24, 40). In EPEC, the expression of virulence factors is also regulated in response to culture conditions that mimic in vivo regulatory signals (5, 27, 37, 44). We found that distinct regulatory sequences in the *LEE5* promoter region are involved in the regulatory response to these conditions (Fig. 6). Negative regulation by growth in rich medium or at temperatures below 37°C involves factors that act directly on the promoter (Fig. 6). The repression mechanism mediated by temperatures above 37°C and by the presence of ammonium in the culture medium



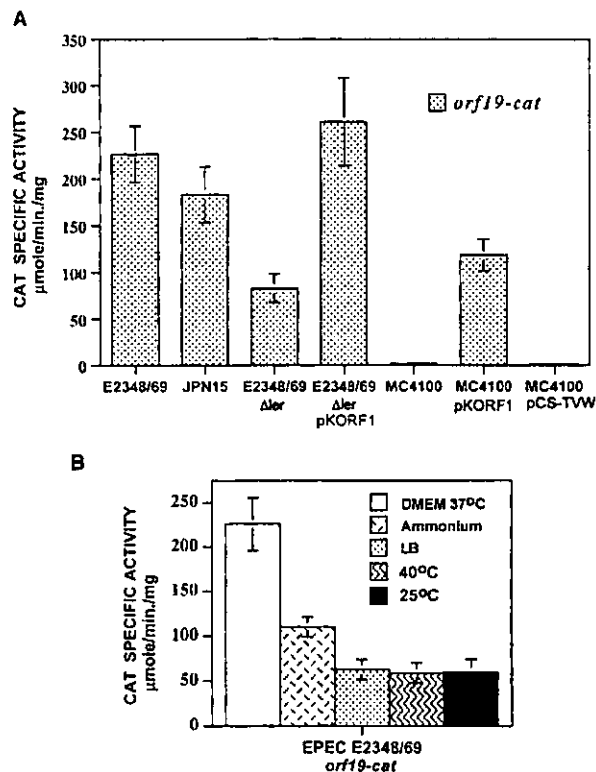


FIG. 7. Regulation of *orf19*. (A) Expression of *orf19* requires the Ler protein. The transcriptional activity directed by the *orf19-cat* fusion in pORF19 was tested in different strains as described in the legend to Fig. 4A. (B) Effect of the growth medium, the presence of ammonium, and temperature on *orf19* expression. EPEC E2348/69 carrying the *orf19-cat* fusion (pORF19) was grown under different conditions to determine CAT activity, as described in the legend to Fig. 6.

is dependent on sequences located upstream from the putative promoter, between positions  $-157$  and  $-122$  and positions  $-204$  and  $-157$ , respectively (Fig. 6). These motifs overlap with the sequence presumably required for negative regulation by an unknown factor and the putative Ler-binding region, respectively (Fig. 3A), suggesting the existence of different regulatory mechanisms that probably involve additional *trans*-acting factors. Neither ammonium nor high temperature is a common regulatory signal for the regulation of virulence factors. However, both can be found during transit along the intestinal lumen, and they may represent signals indicating harmful or inappropriate niches for colonization (13, 44).

#### ACKNOWLEDGMENTS

We particularly thank Susana López, Mario Rocha, Joaquín Sánchez, and Y. Martínez-Laguna for helpful discussions. We also thank Martha G. Sosa, Francisco Santana, and Alejandra Vázquez for technical assistance.

C.S.-S. was supported by a Ph.D. fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México (no. 91904), and from the Universidad Nacional Autónoma de México. This research was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACYT 27831-N), and from the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN206594).

#### REFERENCES

1. Abe, A., M. de Grado, R. A. Pfuetzner, C. Sánchez-SanMartín, R. DeVinney, J. L. Puente, N. C. J. Strynadka, and B. B. Finlay. 1999. Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion. *Mol. Microbiol.* 33:1162–1174.
2. Atlung, T., and H. Ingmer. 1997. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* 24:7–17.
3. Brosius, J. 1984. Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene* 27:151–160.
4. Bustamante, V. H., E. Calva, and J. L. Puente. 1998. Analysis of *cis*-acting elements required for *bfpA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180:3013–3016.
5. Bustamante, V. H., F. J. Santana, E. Calva, and J. L. Puente. 2001. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC): Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol. Microbiol.* 39:664–677.
6. Calderwood, S. B., and J. J. Mekalanos. 1988. Confirmation of the Fur operator site by insertion of a synthetic oligonucleotide into an operon fusion plasmid. *J. Bacteriol.* 170:1015–1017.
7. Casadaban, M. J. 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* 104:541–555.
8. Cava, J. R., P. M. Elias, D. A. Turowski, and K. D. Noel. 1989. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 genetic regions encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on bean plants. *J. Bacteriol.* 171:8–15.
9. DeVinney, R., A. Gauthier, A. Abe, and B. B. Finlay. 1999. Enteropathogenic *Escherichia coli*: a pathogen that inserts its own receptor into host cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 55:961–976.
10. DiRita, V. J., N. C. Engleberg, A. Heath, A. Miller, J. A. Crawford, and R. Yu. 2000. Virulence gene regulation inside and outside. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 355:657–665.
11. Donnenberg, M. S., J. B. Kaper, and B. B. Finlay. 1997. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol.* 5:109–114.
12. Dorman, C. J., J. C. Hinton, and A. Free. 1999. Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. *Trends Microbiol.* 7:124–128.
13. Edwards, R. A., and J. L. Puente. 1998. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol.* 6:282–287.
14. Elliott, S. J., S. W. Hutcheson, M. S. Dubois, J. L. Mellies, L. A. Wainwright, M. Batchelor, G. Frankel, S. Knutton, and J. B. Kaper. 1999. Identification of CesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 33:1176–1188.
15. Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Girón, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright, S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel, and J. B. Kaper. 2000. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 68:6115–6126.
16. Elliott, S. J., L. A. Wainwright, T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, Y. K. Deng, L. C. Lai, B. P. McNamara, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* 28:1–4.
17. Foubister, V., I. Rosenshine, M. S. Donnenberg, and B. B. Finlay. 1994. The *eaeB* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* is necessary for signal transduction in epithelial cells. *Infect. Immun.* 62:3038–3040.
18. Frankel, G., A. D. Phillips, I. Rosenshine, G. Dougan, J. B. Kaper, and S. Knutton. 1998. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol. Microbiol.* 30:911–921.
19. Friedberg, D., T. Umanski, Y. Fang, and I. Rosenshine. 1999. Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 34:941–952.
20. Garrett, S., R. K. Taylor, T. J. Silhavy, and M. L. Berman. 1985. Isolation and characterization of *ΔompB* strains of *Escherichia coli* by a general method based on gene fusions. *J. Bacteriol.* 162:840–844.
21. Gómez-Duarte, O. G., and J. B. Kaper. 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63:1767–1776.
22. Gottesman, M. E., and M. B. Yarmolinsky. 1968. Integration-negative mutants of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* 31:487–505.
23. Guterman, S. K., and C. L. Howitt. 1979. Rho and ribosome mutation interaction: lethality of *rho-15* in *rpsL* or *rpsE* strains, and *rho-15* methionine auxotrophy in *rps+* strains of *Escherichia coli*. *Genetics* 93:353–360.
24. Harel, J., and C. Martin. 1999. Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 30:131–155.
25. Jarvis, K. G., J. A. Girón, A. E. Jerse, T. K. McDaniel, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7996–8000.

26. Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall, and J. B. Kaper. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7839-7843.
27. Kenny, B., A. Abe, M. Stein, and B. B. Finlay. 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* 65:2606-2612.
28. Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey, and B. B. Finlay. 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91:511-520.
29. Kenny, B., and B. B. Finlay. 1995. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7991-7995.
30. Kenny, B., L. C. Lai, B. B. Finlay, and M. S. Donnenberg. 1996. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 20:313-323.
31. Knutton, S., J. Adu-Bobie, C. Bain, A. D. Phillips, G. Dougan, and G. Frankel. 1997. Down regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion. *Infect. Immun.* 65:1644-1652.
32. Knutton, S., I. Rosenshine, M. J. Pallen, I. Nisan, B. C. Neves, C. Bain, C. Wolff, G. Dougan, and G. Frankel. 1998. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J.* 17:2166-2176.
33. Lai, L.-C., L. A. Wainwright, K. D. Stone, and M. S. Donnenberg. 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.
34. Lange, R., M. Barth, and R. Hengge-Aronis. 1993. Complex transcriptional control of the  $\sigma^S$ -dependent stationary-phase-induced and osmotically regulated *osmY* (*csi-5*) gene suggests novel roles for Lrp, cyclic AMP (cAMP) receptor protein-cAMP complex, and integration host factor in the stationary-phase response of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:7910-7917.
35. Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155:377-389.
36. Levine, M. M., E. J. Bergquist, D. R. Nalin, D. H. Waterman, R. B. Hornick, C. R. Young, and S. Sotman. 1978. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* i:1119-1122.
37. Martínez-Laguna, Y., E. Calva, and J. L. Puente. 1999. Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 33:153-165.
38. McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1664-1668.
39. McDaniel, T. K., and J. B. Kaper. 1997. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 23:399-407.
40. Mekalanos, J. J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* 174:1-7.
41. Mellies, J. L., S. J. Elliott, V. Sperandio, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1999. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol. Microbiol.* 33:296-306.
42. Nash, H. A. 1981. Integration and excision of bacteriophage lambda: the mechanism of conservation site specific recombination. *Annu. Rev. Genet.* 15:143-167.
43. Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142-201.
44. Puente, J. L., D. Bieber, S. W. Ramer, W. Murray, and G. K. Schoolnik. 1996. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol. Microbiol.* 20:87-100.
45. Robins-Browne, R. M. 1987. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev. Infect. Dis.* 9:28-53.
46. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
47. Sperandio, V., J. L. Mellies, W. Nguyen, S. Shin, and J. B. Kaper. 1999. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:15196-15201.
48. Tobe, T., T. Hayashi, C. G. Han, G. K. Schoolnik, E. Ohtsubo, and C. Sasakawa. 1999. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. *Infect. Immun.* 67:5455-5462.
49. Tobe, T., G. K. Schoolnik, I. Sobel, V. H. Bustamante, and J. L. Puente. 1996. Cloning and characterization of *bfpTVW* genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 21:963-975.
50. Tobe, T., I. Tatsuno, E. Katayama, C. Y. Wu, G. K. Schoolnik, and C. Sasakawa. 1999. A novel chromosomal locus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), which encodes a *bfpT*-regulated chaperone-like protein, TrcA, involved in microcolony formation by EPEC. *Mol. Microbiol.* 33:741-752.
51. Wolff, C., I. Nisan, E. Hanski, G. Frankel, and I. Rosenshine. 1998. Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 28:143-155.
52. Yamada, H., T. Yoshida, K. Tanaka, C. Sasakawa, and T. Mizuno. 1991. Molecular analysis of the *Escherichia coli* *hns* gene encoding a DNA-binding protein, which preferentially recognizes curved DNA sequences. *Mol. Gen. Genet.* 230:332-336.

## ANEXO II

# Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion

Akio Abe,<sup>1,3</sup> Myriam de Grado,<sup>1</sup> Richard A. Pfuetzner,<sup>2</sup> Claudia Sánchez-SanMartín,<sup>4</sup> Rebekah DeVinney,<sup>1</sup> José Luis Puente,<sup>1,4</sup> Natalie C. J. Strynadka<sup>2</sup> and B. Brett Finlay<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Laboratory, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada V6T 1Z3.

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada V6T 1Z3.

<sup>3</sup>Department of Bacteriology, The Kitasato Institute, Minato-ku, Tokyo 108, Japan.

<sup>4</sup>Molecular Microbiology Department, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico.

## Summary

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) secretes several Esps (*E. coli*-secreted proteins) that are required for full virulence. Insertion of the bacterial protein Tir into the host epithelial cell membrane is facilitated by a type III secretion apparatus, and at least EspA and EspB are required for Tir translocation. An EPEC outer membrane protein, Intimin, interacts with Tir on the host membrane to establish intimate attachment and formation of a pedestal-like structure. In this study, we identified a Tir chaperone, CesT, whose gene is located between *tir* and *eae* (which encodes Intimin). A mutation in *cesT* abolished Tir secretion into culture supernatants and significantly decreased the amount of Tir in the bacterial cytoplasm. In contrast, this mutation did not affect the secretion of the Esp proteins. The level of *tir* mRNA was not affected by the *cesT* mutation, indicating that CesT acts at the post-transcriptional level. The *cesT* mutant could not induce host cytoskeletal rearrangements, and displayed the same phenotype as the *tir* mutant. Gel overlay and GST pulldown assays demonstrated that CesT specifically interacts with Tir,

but not with other Esp proteins. Furthermore, by using a series of Tir deletion derivatives, we determined that the CesT binding domain is located within the first 100 amino-terminal residues of Tir, and that the pool of Tir in the bacterial cytoplasm was greatly reduced when this domain was disrupted. Interestingly, this domain was not sufficient for Tir secretion, and at least the first 200 residues of Tir were required for efficient secretion. Gel filtration studies showed that Tir–CesT forms a large multimeric complex. Collectively, these results indicate that CesT is a Tir chaperone that may act as an anti-degradation factor by specifically binding to its amino-terminus, forming a multimeric stabilized complex.

## Introduction

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a major cause of diarrhoea in young children (Donnenberg and Kaper, 1992). Related pathogens that cause disease using similar mechanisms include enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7 (Francis *et al.*, 1986; Tzipori *et al.*, 1987, 1988), rabbit enteropathogenic *E. coli* (REPEC) (Takeuchi *et al.*, 1978; Hall *et al.*, 1990; Licois *et al.*, 1991), *E. coli* O45 (pig) (Helie *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 1994), dog enteropathogenic *E. coli* (DEPEC) strain 4221 (Beaudry *et al.*, 1996; An *et al.*, 1997) and *Citrobacter rodentium* (mouse) (Schauer and Falkow, 1993; Frankel *et al.*, 1994, 1996). These pathogens cause a characteristic histopathological lesion termed an attaching/effacing (A/E) lesion that is defined by the intimate attachment of bacteria to the epithelial surface, and the effacement (disappearance) of host cell microvilli (Cantey *et al.*, 1981; Moon *et al.*, 1983). Alteration of cytoskeletal components beneath adherent bacteria results in the formation of a pedestal-like structure that can extend to a pseudopod. The A/E lesion is mediated by bacteria–host cell interactions, including triggering of host signal transduction pathways and cytoskeletal arrangements (Finlay *et al.*, 1992; Rosenshine *et al.*, 1992; Kenny *et al.*, 1997). This lesion is required for full virulence *in vivo* (Abe *et al.*, 1998).

EPEC A/E lesions require the products of a series of genes encoded by a 35 kbp locus termed the LEE (locus of enterocyte effacement) (McDaniel *et al.*, 1995;

Received 22 February, 1999; revised 24 June, 1999; accepted 28 June, 1999. \*For correspondence at Biotechnology Laboratory, University of British Columbia, Room 237, Wesbrook Building, 6174 University Boulevard, Vancouver, BC, Canada V6T 1Z3. E-mail bfinlay@unixg.ubc.ca; Tel. (+1) 604 822 2210; Fax (+1) 604 822 9830.

McDaniel and Kaper, 1997), which includes the *esc* cluster, *tir*, *orfU*, *eae*, *espA*, *espD*, *espB* and *espF*. The *esc* cluster encodes a type III secretion apparatus responsible for secretion of the Esp (EPEC secreted proteins) (Jarvis *et al.*, 1995). *tir* and *eae* encode Tir (Kenny *et al.*, 1997) and intimin (Jerse *et al.*, 1990), respectively, which are required for intimate attachment *in vitro*. At least four secreted proteins, EspA (Kenny *et al.*, 1996), EspB (Donnenberg *et al.*, 1993), EspD (Lai *et al.*, 1997) and EspF (McNamara and Donnenberg, 1998), encoded by *espA*, *espB*, *espD* and *espF*, respectively, are secreted via the type III secretion apparatus. EspA appears to form a filamentous structure on the bacterial surface and may act as a channel to deliver proteins into the host cell (Knutton *et al.*, 1998). Although the function of EspB and EspD are still unclear, both proteins are involved in the induction of host-signal transduction pathways (Foubister *et al.*, 1994; Lai *et al.*, 1997), and EspB is translocated directly into the host cell membrane and cytoplasm (Wolff *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1998).

Translocated intimin receptor (Tir) is delivered and translocated into the host plasma membrane, and EspA and EspB and the type III secretion system are needed for its translocation (Kenny *et al.*, 1997). Although the mechanisms of Tir insertion into host cell membranes are unknown, at least three functions have been identified for Tir (Kenny *et al.*, 1997). Tir serves as a cell surface receptor for intimin. The second function of Tir is to nucleate actin and other cytoskeletal components after intimin binding. The third function is to transmit additional signals to the host cell once Tir-intimin interactions occur. These events include tyrosine phosphorylation of phospholipase C $\gamma$  and other host proteins (Kenny and Finlay, 1997).

Like EPEC, several Gram-negative pathogens, including *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* and *Erwinia* (a plant pathogen), use a type III secretion apparatus to deliver virulence determinants to eukaryotic cells (Hueck, 1998). Although these virulence factors or effectors are highly divergent, some of their secretory machinery is highly conserved between these pathogens. Indeed, *Yersinia* can secrete a *Shigella* protein and *Salmonella* can secrete a *Yersinia* protein, but only if their respective chaperones are also present (Rosqvist *et al.*, 1995), revealing that the type III secretory chaperones interact specifically with one or two specific effector (secreted) proteins (Cornelis and Wolf-Watz, 1997). The function of some of these chaperones has been characterized in *Yersinia*. A variety of *Yersinia* effectors, which contribute to full virulence, are translocated into the host cytoplasm. Translocation of YopD, YopE and YopH effectors requires the presence of specific cytosolic chaperones termed SycD, SycE and SycH (Syc for specific *Yersinia* chaperones) (Wattiau *et al.*, 1994) respectively. Furthermore, SycD has been shown to serve as the chaperone for both

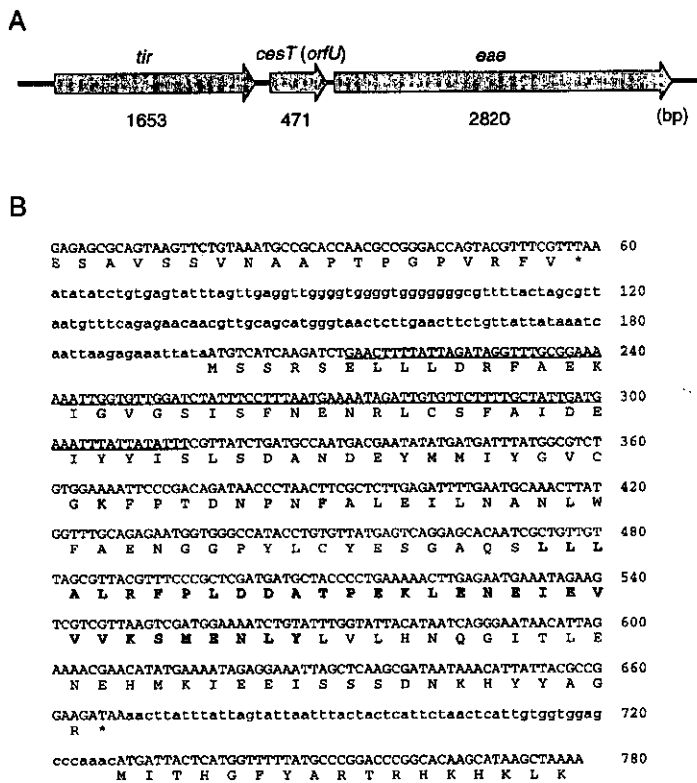
YopD and YopB (Neyt and Cornelis, 1999). Despite their specificity, these proteins share several characteristics, such as the size ( $\approx 16$  kDa), the acidic isoelectric point ( $pI \approx 4.5$ ), an amphipathic  $\alpha$ -helix near the C-terminus, and the *syc* genes are located near their cognate *yop* genes (Wattiau *et al.*, 1996). Recently, SycT, a chaperone for YopT, was identified and showed similar characteristics to the other Syc chaperones (Iriarte and Cornelis, 1998). Although the exact function of the Syc proteins remains unclear, it is thought that they may prevent premature association with other proteins, including those of translocation machinery or other secreted proteins (Woestyn *et al.*, 1996).

CesD, a chaperone for EspB and EspD, is the only chaperone thus far identified for EPEC (Wainwright and Kaper, 1998). This chaperone is a 151-amino-acid protein with a predicted molecular weight of 17.5 kDa. In contrast to other Syc proteins, CesD does not have an acidic  $pI$ , which is predicted to be 7.1, and it contains a large number of lysine residues near its C-terminus. Furthermore, *cesD* is not located in close proximity to any of the *esp* genes, which are separated by 20 kb. A mutation in *cesD* abolished EspD secretion and reduced EspB secretion. CesD was also shown to interact directly with EspD, but not EspB. Both EspB and EspD are translocated to the host cell, with EspB targeted to both the host cell membrane and cytoplasm (Taylor *et al.*, 1998; Wolff *et al.*, 1998), whereas EspD is inserted into the plasma membrane (Wachter *et al.*, 1999). These findings suggest that other EPEC type III secreted proteins, such as Tir, require specific chaperones for their translocation. Sequence analysis showed that a predicted protein, OrfU, encoded by a gene located between *tir* and *eae*, shares similar characteristics to the Syc proteins (Wattiau *et al.*, 1994, 1996; Elliott *et al.*, 1998). Furthermore, a conserved motif was found between Syc proteins and OrfU near the C-termini (Iriarte and Cornelis, 1998). Here, we report that OrfU, herein denominated CesT, indeed functions as a specific chaperone for Tir by binding directly to Tir and forming a multimeric complex that is needed for Tir stability and secretion.

## Results

### Construction of an EPEC *CesT* mutant strain

Tir is inserted into the host cell membrane, where it acts as the receptor for the bacterial outer membrane protein, intimin, allowing intimate adherence. The genes encoding Tir and intimin are located upstream of the *esp* gene cluster. In addition, one open reading frame (ORF), *orfU*, is located between *tir* and *eae* (Fig. 1A). Although the function of *orfU* is unknown, its deduced gene product was hypothesized to be a putative chaperone for Tir based



**Fig. 1.** Genetic map, DNA sequence and deduced amino acid sequence of *cesT* (formerly *orfU*).

**A.** Organization of *tir*, *cesT* and *eae* genes in the LEE. Arrows indicate the direction of open reading frames, and their lengths (bp) are indicated below.

**B.** The nucleotide and amino acid sequences of *tir* (carboxyl terminal region), *cesT* and *eae* (amino-terminal region). Underlined sequence indicates the 103 bp deletion in  $\Delta cesT$ . A conserved sequence between CesT and SycE, SycH and SycT is marked in bold (Iriarte and Cornelis, 1998). The *cesT* accession number in EMBL/GenBank/DBJ is AF022236.

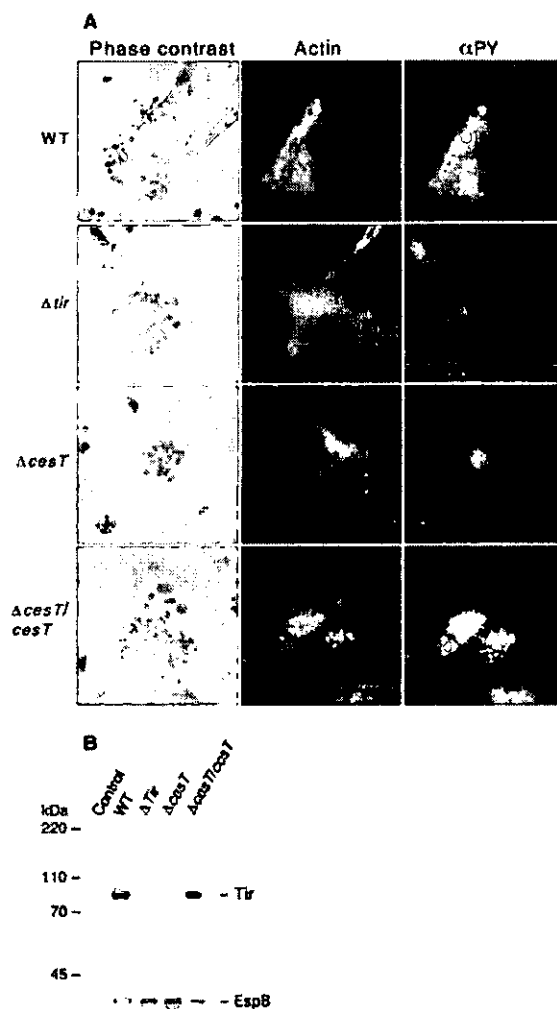
on the following characteristics: (i) like the Syc proteins, OrfU is a small protein (156 residues, 17.7 kDa) with a predicted acidic pI of 4.3; and (ii) the C-terminus of OrfU has homology to other chaperones, including SycE, SycH and SycT (Fig. 1B) (Wattiau *et al.*, 1994, 1996; Iriarte and Cornelis, 1998). Based on these observations, we set out to determine whether OrfU acts as a chaperone for Tir. Subsequently, we renamed OrfU as CesT (for Chaperone of E. coli secreted Tir) according with EPEC nomenclature for the previously characterized CesD, an EspD chaperone (Wainwright and Kaper, 1998). To analyse the role of CesT in EPEC, a non-polar deletion was engineered into *cesT* as described in *Experimental Procedures*. The position of the deletion in *cesT* is illustrated in Fig. 1B, and the resulting mutant strain was designated as EPEC  $\Delta cesT$ .

*CesT* is required for formation of the A/E lesion beneath the adherent bacteria and translocation of Tir to the host cell membrane

To analyse whether CesT is involved in A/E lesion formation, HeLa epithelial cells were infected with EPEC wild type,  $\Delta tir$  and  $\Delta cesT$  strains, then cytoskeletal actin and

phosphorylated proteins were labelled with phalloidin-Texas red and fluorescently labelled anti-phosphotyrosine antibody respectively. Infection with wild-type EPEC induced the accumulation of actin and tyrosine-phosphorylated proteins beneath the adherent bacteria, and these nucleations were observed as horseshoe-like structures (Fig. 2A). In contrast, infection with either the EPEC  $\Delta cesT$  or  $\Delta tir$  strains did not elicit A/E lesion formations.

The mutation in *eae* shows a similar phenotype to that of  $\Delta cesT$ ; neither form pedestal-like structures (Rosenshine *et al.*, 1992). Furthermore, *tir*, *cesT* and *eae* are transcribed as a single mRNA under the control of a promoter located upstream of *tir* (C. Sánchez-SanMartín and J. L. Puente, unpublished observation). To rule out a possible polar effect of the *cesT* mutation on *eae* expression, the cloned *cesT* was introduced into EPEC  $\Delta cesT$ . Complementation of EPEC  $\Delta cesT$  with the cloned *cesT* *in trans* restored ability of the A/E lesion formation in infected HeLa cells (Fig. 2A), while EPEC  $\Delta cesT$  containing just the cloning vector did not. These results indicate that the lack of cytoskeletal rearrangements can be attributed to the disruption of *cesT*, and this non-polar mutation does not affect expression of *eae* and other downstream loci.



**Fig. 2.** Accumulation of cytoskeletal actin and tyrosine-phosphorylated proteins beneath bacteria in cultured epithelial cells (A) and translocation of Tir to the host cell membrane (B).

A. HeLa cells ( $10^5$ ) were infected for 3 h with EPEC or isogenic mutant strains. Infected HeLa cells were fixed, then actin and tyrosine-phosphorylated proteins ( $\alpha$ -PY) were detected by immunofluorescence microscopy.

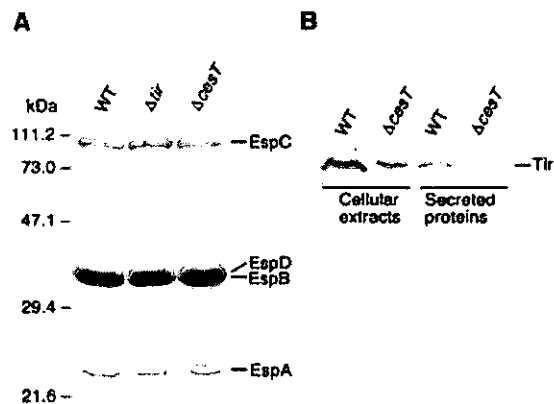
B. HeLa cells ( $5 \times 10^5$ ) were infected for 3.5 h with EPEC or isogenic mutant strains. Triton X-100 soluble (membrane) fraction was resolved by 8% SDS-PAGE, and proteins were transferred to nitrocellulose for immunoblotting with monoclonal anti-Tir and anti-EspB antisera. Strains: wild-type EPEC (WT); Tir deletion strain ( $\Delta tir$ ); CesT deletion strain ( $\Delta cesT$ ); CesT mutant strain carrying plasmid pACYC-cesT, which contains a functional cesT ( $\Delta cesT/cesT$ ).

A/E lesion formation requires Tir translocation to the host cell membrane (Kenny *et al.*, 1997). As EPEC  $\Delta cesT$  is unable to form A/E lesions, we investigated whether this was due to an inability to translocate Tir.

We also examined the effect on insertion of a second secreted protein, EspB, into the host cell membrane. Triton X-100-soluble membranes from HeLa cells infected with either EPEC wild type,  $\Delta tir$ ,  $\Delta cesT$  and  $\Delta cesT/cesT$  strains were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose for immunoblotting with anti-EPEC Tir and anti-EPEC EspB antisera. As shown in Fig. 2B, infection with the EPEC  $\Delta cesT$  did not result in Tir translocation to the host cell membrane. Tir translocation was restored by EPEC  $\Delta cesT$  carrying the cloned *cesT* in trans. In contrast, delivery of EspB to the HeLa cell membrane (Wolff *et al.*, 1998) was unaffected by mutations in either *cesT* or *tir*. These results suggest that *cesT* is necessary for Tir translocation to the host cell membrane.

#### *CesT* is required for the stable production and secretion of Tir

As described above, a mutation in *cesT* severely affected the A/E lesion phenotypes in HeLa cells and Tir translocation. In order to investigate the defect caused by *cesT* mutation, the secretion of EPEC protein was analysed using SDS-PAGE and immunoblotting. As shown in Fig. 3A, the secretion of EspA, EspB, EspC and EspD was not affected by the *cesT* mutation. As secretion of Tir in EPEC cannot be detected by Coomassie staining (Fig. 3A), immunoblotting was carried out using an anti-EPEC Tir antibody. In contrast to the normal secretion of Esp proteins into DMEM, the secretion of Tir was abolished (Fig. 3B). Furthermore,



**Fig. 3.** Secreted protein profiles (A) and immunoblot analysis (B) of EPEC wild type and mutant strains.

A. Bacteria were grown in DMEM culture media and secreted proteins were precipitated by addition of 10% TCA, resolved by 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Strains: wild-type EPEC (WT); *tir* deletion strain ( $\Delta tir$ ); *cesT* deletion strain ( $\Delta cesT$ ).

B. Immunoblot analysis of EPEC whole-cell extracts and secreted proteins. Anti-EPEC Tir antisera was used for immuno-detection.

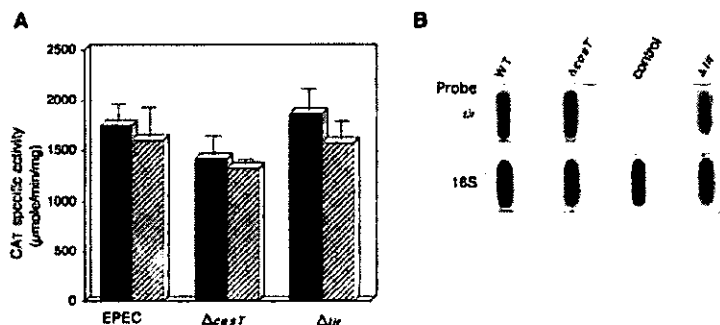


Fig. 4. Transcriptional analyses of *tir* in the presence or absence of CesT.

A. EPEC (WT) and *cesT* ( $\Delta cesT$ ) and *tir* ( $\Delta tir$ ) deletion strains were transformed with the *tir*-*cat* transcriptional fusion plasmid pTIR553. CAT activity was determined from culture samples obtained during late exponential phase in DMEM at 37°C (OD<sub>600</sub> = 0.8, filled bars; OD<sub>600</sub> = 1.0, hatched bars).

B. Total RNA extracted from cultured samples EPEC (WT),  $\Delta cesT$  and  $\Delta tir$  grown in DMEM at 37°C (OD<sub>600</sub> = 0.6) was hybridized with DNA probes for *tir* and the ribosomal 16S RNA gene. To show specific hybridization of the *tir* probe, total RNA extracted from *Salmonella typhi* was used as a negative control.

accumulation of Tir within the bacterial cytoplasm of EPEC  $\Delta cesT$  was also greatly reduced (Fig. 3B). These results suggest that CesT is required for the stable accumulation and secretion of appropriate levels of Tir that allow the formation of A/E lesions.

#### The effect of *cesT* mutation on *tir* transcription

EPEC  $\Delta cesT$  showed a significant reduction in the levels of Tir, in both the supernatant TCA precipitate and in the whole-cell extracts (Fig. 3B). To rule out a possible effect of the *cesT* deletion on *tir* transcription, we analysed the expression of a *tir*-*cat* transcriptional fusion in EPEC wild type,  $\Delta cesT$  and  $\Delta tir$  (Fig. 4A). These strains were transformed with plasmid pTIR553, which contains a transcriptional fusion between the 5' upstream promoter region of *tir* and a promoterless reporter gene encoding the chloramphenicol acetyl transferase (C. Sánchez-San-Martín and J. L. Puente, unpublished). The CAT activity was determined from culture samples of these strains grown in DMEM at 37°C. As shown in Fig. 4A, expression of *tir*-*cat* was not significantly affected by the mutation in *cesT*.

These observations were further confirmed by slot blot hybridization. A DNA probe corresponding to 720 bp of the *tir* structural gene was hybridized with total RNA purified from the EPEC wild type and mutant strains grown in DMEM at 37°C. In agreement with the CAT activity results, the levels of *tir* transcript were similar between EPEC wild type and  $\Delta cesT$  (Fig. 4B). A *tir* transcript was also detected in EPEC  $\Delta tir$ , which contains a non-polar 810bp deletion in *tir*, as the *tir* probe still hybridizes to the truncated *tir* transcript. These results indicate that the effect of the *cesT* mutation described above is due to post-transcriptional effects probably related to Tir-CesT interactions.

#### Specific interactions of CesT with Tir

The results described above further supported the hypothesis that CesT may serve as a specific chaperone of Tir. To evaluate whether CesT indeed interacts with Tir, we carried out an affinity gel overlay blot using purified GST-CesT fusion as the probe (Fig. 5). As shown in Fig. 3A, the secretion of Tir into DMEM-cultured

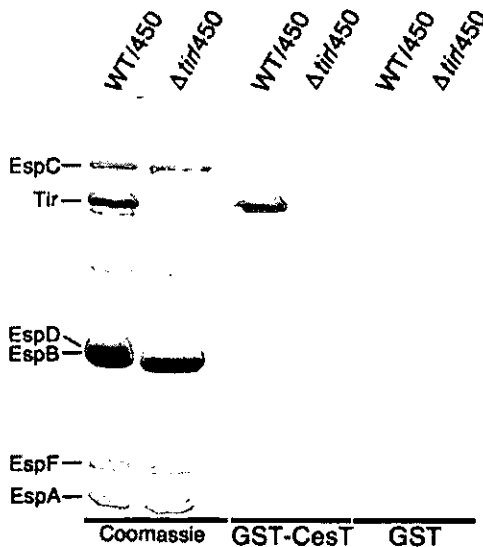


Fig. 5. Interaction of CesT with Tir detected by gel overlay blotting. Bacteria containing pCVD450 (encoding the *per* regulator) were grown in modified M9 media, and the secreted proteins were precipitated by addition of 10% TCA, and then resolved by 12% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose filter. The filters containing immobilized secreted proteins were overlaid with GST-CesT (middle panel) or GST (right panel) at a final concentration of 1  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , then bound probes were detected with an anti-GST antibody. Coomassie blue staining of secreted proteins is shown in the left panel. Strains: wild-type EPEC with pCVD450 (WT/450); *tir* deletion strain with pCVD450 ( $\Delta tir/450$ ).

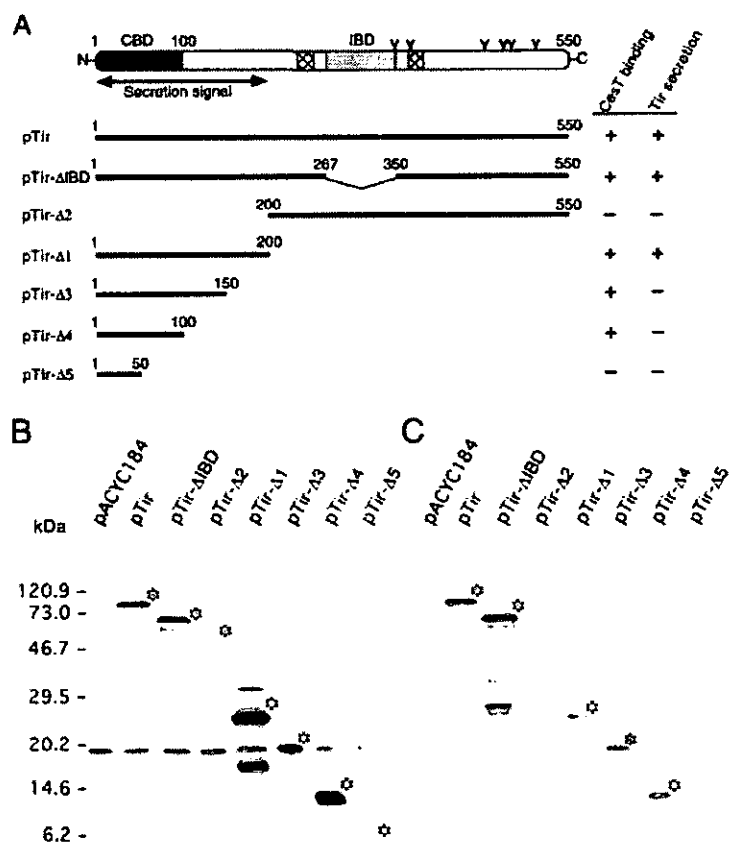


supernatants is not detectable by Coomassie staining. To facilitate secretion of Tir into culture supernatants, pCVD450, which encodes the *per* positive regulator, was introduced into EPEC wild type and  $\Delta tir$  *in trans*. Bacteria were grown in modified M9 media, and cultured supernatants were collected by TCA precipitation, then secreted proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. The filters containing immobilized EPEC-secreted proteins were incubated with GST-CesT or GST alone, and the bound GST-CesT or GST was detected with an anti-GST antibody. Results from this experiment clearly showed that GST-CesT specifically interacts with a single EPEC-secreted protein corresponding to Tir. Furthermore, this band was not detected in the lane containing secreted proteins from EPEC  $\Delta tir$ , nor when GST alone was used as the probe. These results indicate that CesT specifically binds to Tir and does not bind to other Esps.

#### Identification of the CesT-binding domain (CBD) in Tir

General chaperones involved in protein folding bind at multiple substrate sites (Kumamoto, 1991). In contrast,

Syc chaperones interact with a unique binding domain at the N-terminus of their cognate Yop proteins (Woestyn *et al.*, 1996). To identify if CesT binds to only one domain of Tir, we constructed various Tir derivatives tagged with HSV at the C-terminus (Fig. 6A), and these derivatives were introduced into EPEC  $\Delta tir$ . Bacterial cell extracts prepared from these strains were subjected to immunoblot analysis to confirm expression of the Tir-HSV derivatives (Fig. 6B). All Tir derivatives reacted with an anti-HSV monoclonal antibody, and these proteins were detected at the expected molecular masses marked by asterisks in Fig. 6B. Using the same cell extracts, a GST pull-down assay was performed, as described in *Experimental Procedures* (Fig. 6C). GST-CesT or GST alone immobilized on glutathione-agarose beads, was incubated with EPEC whole-cell extracts, and beads were pelleted by centrifugation. The resulting proteins co-precipitating with the GST-CesT beads were analysed by immunoblotting using the anti-HSV monoclonal antibody. As expected, full-length Tir (residues 1-550) bound to CesT (Fig. 6C, lane pTir). Tir lacking residues 267-350, which encompass the intimin-binding domain (IBD) (de Grado *et al.*,



**Fig. 6.** Domain mapping of CesT-binding region in Tir.

**A.** Schematic representation of the Tir derivatives and summary of CesT binding and Tir secretion results. CesT-binding domain (CBD, residues 1-100) and intimin-binding domain (IBD, residues 277-332) are indicated by black and grey boxes. Tir secretion signals (residues 1-200) and predicted two transmembrane domains (234-254, 363-382) (Kenny *et al.*, 1997) are indicated by an arrow and hatched boxes. Y indicates Tir tyrosine residues.

**B.** Immunoblot analysis of Tir expression in EPEC  $\Delta tir$  whole-cell extracts. Bacterial whole-cell extracts were prepared from EPEC  $\Delta tir$  containing cloned *Tir*-HSV fusion genes, and the resulting lysates were resolved by 12% SDS-PAGE, then analysed by immunoblotting with the anti-HSV monoclonal antibody. Asterisks represent predicted Tir polypeptides.

**C.** Interaction of CesT with Tir in a GST pull-down assay. EPEC whole-cell extracts were incubated with agarose-immobilized GST-CesT fusion protein (20  $\mu$ g). Proteins bound to the beads were resolved by 12% SDS-PAGE, then analysed by immunoblotting using the anti-HSV monoclonal antibody.

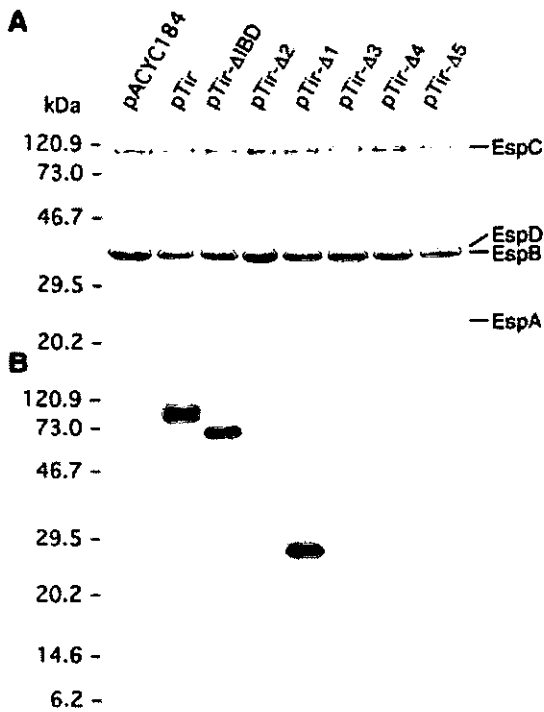


Fig. 7. Secretion profile of EPEC  $\Delta tir$  containing various cloned *tir* derivatives.

A. EPEC  $\Delta tir$  mutant strains containing various *Tir*-HSV clones were grown in DMEM culture media, and secreted proteins were precipitated by addition of 10% TCA, then resolved by 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue.

B. Immunoblot analysis of EPEC-secreted proteins. Anti-HSV monoclonal antibody was used for immunodetection.

1999), also bound to CesT, indicating that the IBD does not overlap with the CesT-binding domain (CBD). Furthermore, Tir residues 1–200, 1–150 and 1–100 bound to CesT with signals of similar intensities. However, CesT interactions with Tir residues 1–50 were not detected, even when the filter was overexposed. Tir derivatives were also not coprecipitated by GST alone (data not shown). These results indicate that CesT and intimin bind to separate domains at the N-terminus and the central region of Tir, respectively, and that N-terminal residues 50–100 are essential for CesT–Tir interaction.

#### Identification of the region required for Tir secretion

In *Yersinia*, the SycE-binding domain and the secretion signal are located within the N-terminus of YopE (Woestyn *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1997). To analyse whether the Tir secretion signal is located at the N-terminus of Tir, secreted proteins were prepared from EPEC  $\Delta tir$  containing the different Tir–HSV derivatives and analysed by immunoblotting. To ascertain that each Tir derivative did not affect secretion of the Esp proteins, secreted proteins were stained with Coomassie (Fig. 7A). We found similar amounts of Esp proteins in each lane, indicating that these fusion proteins do not interfere with Esp secretion. The same samples were used for immunoblotting with the anti-HSV antibody (Fig. 7B). As expected, intact Tir was secreted from EPEC  $\Delta tir$  carrying pTir (Fig. 7B, lane pTir), indicating that the HSV epitope at the C-terminus does not interfere with Tir secretion. We have previously confirmed that EPEC  $\Delta tir$  was complemented by a Tir–HSV clone *in trans*, and that this strain could still trigger host cytoskeletal rearrangements in infected HeLa cells (Kenny *et al.*, 1997). Tir lacking residues 267–350,

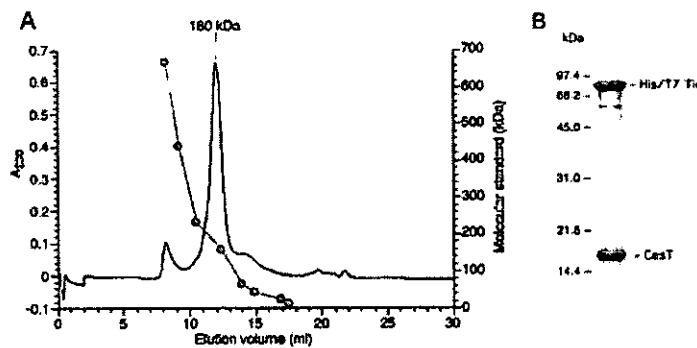


Fig. 8. Tir–CesT complex.

A. Gel filtration analysis of the Tir–CesT complex. Bacterial lysates were prepared of *E. coli* BL21 (DE3) containing the pET-tir/cesT, which produces His/T7 Tir fusion and CesT, and the lysate was passed through a nickel-NTA column. After washing, His/T7 Tir bound to the nickel-NTA column was eluted and applied to a gel filtration column. Absorption (optical density at 280 nm) of eluted proteins was plotted, and the column calibrated with size standards in the same buffer (grey line).

B. Coomassie staining of the His/T7 Tir and its copurified protein. The peak corresponding to the 180 kDa peak was collected and resolved by 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie.

whose domain is involved in intimin binding, was also secreted into culture supernatants, indicating that the intimin-binding domain is not involved in Tir secretion. Interestingly, Tir residues 1–100 encompassing the CBD were not secreted into culture supernatants (Fig. 7B, lane pTir- $\Delta$ 4), and at least residues 1–200 were required for detectable Tir secretion (Fig. 7B, lane pTir- $\Delta$ 1). These results indicate that (i) the CBD is sufficient for stable Tir production, but not for Tir secretion, and (ii) the Tir secretion signal may be located downstream from the CBD, or may overlap with the CBD and extends into residues 100–200.

#### Characterization of the CesT–Tir complex by co-purification and gel filtration.

The results described above show that CesT specifically interacts with the N-terminus of Tir. In order to further explore the Tir–CesT interaction and to determine the size of this putative complex, a pET28 vector derivative containing His/T7 *tir* fusion and *cesT* (pET-*tir/cesT*) was introduced into *E. coli* BL21 (DE3) to coexpress both proteins. His/T7 Tir was purified by a nickel-NTA column and bound His/T7 Tir was specifically eluted with imidazole. The sample from this nickel-NTA column was then applied to a gel filtration column. We found a dominant peak that eluted at a size corresponding to 180 kDa, based on calibration of the column with size standards in the same buffer (Fig. 8A). This peak was resolved by SDS–PAGE, and two predominant bands were detected with Coomassie staining (Fig. 8B). One band corresponded to an 82 kDa protein, while the other was an 18 kDa protein. Although the 82 kDa protein is higher than the calculated molecular weight of His/T7 Tir (60.3 kDa, consisting of 3.8 kDa of His/T7 and 56.5 kDa of Tir), native Tir (56.5 kDa) is also detected as a 78 kDa molecule on the SDS–PAGE (Kenny *et al.*, 1997). The 18 kDa of copurified protein was blotted to PVDF filter and its amino-terminal sequence was determined. Six residues (SSRSEL) derived from its amino-terminus were identical to those predicted for the *cesT* product, except for the lack of the first methionine. The predicted molecular weight of CesT is 17.7 kDa, again confirming that the 18 kDa protein is CesT. Collectively, these results indicate that CesT and Tir form a large complex, which is stable during affinity purification and gel filtration. Furthermore, the molecular weight of this complex (180 kDa) is greater than the sum of the CesT and Tir molecular weights ( $\approx$  90 kDa), indicating that the complex is multimeric.

#### Discussion

A unique feature of EPEC pathogenesis is that this pathogen delivers a bacterial protein, Tir, into the host epithelial plasma membrane where it serves as a bacterial receptor

for intimin. This delivery is facilitated by the type III apparatus, and EspA and EspB are required for Tir translocation (Kenny *et al.*, 1997). So far various chaperones involved in the type III apparatus have been reported in *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*. However, only one chaperone, CesD, has been reported in EPEC (Wainwright and Kaper, 1998), and nothing is known about the stoichiometric relationship between chaperones and effectors that use type III secretion apparatus. We report here the identification and further characterization of CesT, a specific chaperone for Tir.

A mutation in *cesT* affected the ability of EPEC to induce cytoskeletal rearrangements and protein phosphorylation (Fig. 2A), and these phenotypes were similar to those of EPEC  $\Delta$ *tir*. Furthermore, CesT was essential for both Tir translocation to the host cell membrane (Fig. 2B) and secretion of Tir into culture supernatants, and to maintain a stable pool of Tir in the bacterial cytoplasm (Fig. 3A and B). A similar observation was made for the EPEC *cesD* mutant strain, where EspD did not accumulate within the bacterial cytoplasm (Wainwright and Kaper, 1998). In addition, we confirmed that the decreased amount of Tir within the bacterial cytoplasm in EPEC  $\Delta$ *cesT* was due to post-transcriptional effects by using a *tir-cat* reporter system and RNA slot blot hybridization (Fig. 4).

The results of affinity gel overlay blotting show that CesT specifically interacts with Tir, but not EspA, EspB, EspC, EspD and EspF (Fig. 5). GST pulldown assays using different *tir* deletion derivatives showed that the CesT-binding domain (CBD) was located within Tir residues 1–100 (Fig. 6C). Specific interaction of CesT at the N-terminus of Tir may be a common feature of type III chaperones, as previously shown for the binding domains of the Syc chaperones for YopE (located within residues 15–50) (Woestyn *et al.*, 1996), YopH (residues 20–70) (Woestyn *et al.*, 1996) and YopT (residues 1–124) (Iriarte and Cornelis, 1998). In addition, a conserved motif located at the C-terminus of the Syc chaperones (Iriarte and Cornelis, 1998) was also found at the CesT C-terminus (Fig. 1B). These observations suggest that the function of CesT may be similar to that of the Syc chaperones. Syc chaperones have been proposed to function as anti-association factors (Woestyn *et al.*, 1996), as YopH secretion is restored in a *sycH* mutant when *yopB* and *yopD* are disrupted. In this case, the interaction of SycH with YopH in the bacterial cytoplasm may prevent YopH association with YopB and YopD, which are required for post-secretion events involving targeting of YopH. In this study, the amount of Tir residues 1–50 and 200–550 was greatly reduced in the bacterial cytoplasm, probably due to the lack of the CBD. The reduced amount of Tir in the bacterial cytoplasm was also observed in EPEC  $\Delta$ *cesT* (Fig. 2B). These findings suggest that CesT may act as an

anti-degradation factor. Indeed, the *syncE* mutant did not retain a pool of labelled YopE in its cytoplasm (Cheng *et al.*, 1997). Collectively, the type III secretory chaperones may have a dual function acting as anti-degradation and anti-association factors.

YopE possesses two independent secretion signals at its N-terminus, and both secretion signals are dependent on the type III apparatus (Cheng *et al.*, 1997). One signal is located in the sequence encoding for first 15 amino acids of YopE and is sufficient for the secretion of a fusion protein, even in the absence of SycE. This signal is contained in the *yopE* mRNA, as frameshift mutations still promote secretion of fused reporter proteins (Anderson and Schneewind, 1997). The second signal is located in YopE residues 15–100 and is required for SycE binding. In other words, the second secretion signal is included in the SycE-binding domain. In contrast, the CBD was sufficient for stable maintenance of Tir within bacterial cytoplasm (Fig. 6C), but insufficient for Tir secretion, which requires Tir residues 1–200 (Fig. 7B). Although it is unclear whether this secretion signal overlaps with the CBD, these findings suggest that the secretion mechanism for Tir and Yop proteins may differ. Indeed, YopE was secreted into culture supernatants, even with a *syncE* mutation. In contrast, Tir secretion by the *cesT* mutant was not detectable.

The results of amino acid sequence analysis of CesT showed that the mature form of CesT lacks the first methionine, much like Tir (Kenny *et al.*, 1997). This has been reported for the *Salmonella*-secreted protein SopE (Wood *et al.*, 1996), in which the cleavage of *N*-formyl-methionine is a common modification in *Salmonella* (Miller *et al.*, 1987). A similar *N*-terminal methionine-specific peptidase may be involved in the cleavage of the first methionine of CesT and Tir. Accordingly, Tir, as with other Esp proteins, is secreted without the processing of a typical *N*-terminal signal peptide. Indeed, the cleavage of the first methionine of Tir was not essential for both secretion and translocation of Tir. T7-tagged Tir at the N-terminus, the fusion of which cannot be recognized by *N*-terminal methionine-specific peptidase, could complement EPEC  $\Delta tir$ , and Tir translocation into the host membrane has been detected by an anti-T7 antibody (Kenny *et al.*, 1997).

In this study, we have shown for the first time the multimeric nature of the complex formed by a type III secretory chaperone and its cognate protein. Gel filtration results showed that CesT and His/T7-tagged Tir form a large stable complex of 180 kDa (Fig. 8A). This molecular weight does not correspond to a monomer–monomer complex of CesT and His/T7 Tir (Fig. 8B). Based on their calculated molecular masses, these findings suggest that CesT and Tir may form a hexameric complex of two molecules of Tir and four of CesT, or some other

combinations. This large complex may protect Tir from proteolysis until Tir is inserted into the host membrane. Although we could detect the CesT–Tir complex from *E. coli* whole-cell extracts using Coomassie staining (Fig. 8B), CesT was not detected in EPEC culture supernatants even under conditions in which Tir secretion was enhanced (data not shown). This result indicates that CesT disassociates from Tir, while Tir is secreted and translocated.

In conclusion, we have shown that CesT is required for the secretion of Tir and acts as its chaperone. We identified the CesT-binding domain and the secretion signal at the N-terminus of Tir. We have also shown that Tir and CesT form a large complex, which is needed for stable secretion. Future studies will be needed to determine the precise domain of the CBD and the secretion signal, and their relationship to Tir translocation out of the bacteria and into the host membrane.

## Experimental procedures

### *Bacterial strains, plasmids, oligonucleotides, cell culture and media*

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Oligonucleotides used in this study are listed in Table 2. HeLa cells were maintained and assayed in MEM containing 10% (v/v) fetal calf serum at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. For preparation of EPEC-secreted proteins, EPEC and its mutant strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth overnight at 37°C with shaking, then overnight cultures were diluted into DMEM or modified M9 media and incubated in a CO<sub>2</sub> incubator. For infection, bacteria were grown in LB broth overnight at 37°C without shaking.

### *PCR cloning of cesT*

The 1.6 kilobase pair (kbp) DNA fragment encoding *cesT* (formerly *orfU*) and its flanking region was amplified by PCR using the primers *cesT* (+) and *cesT* (–), and EPEC genomic DNA as the DNA template. The resulting PCR product was digested with *Bam*HI and *Sal*I, and cloned into the *Bam*HI and *Sal*I sites of pBluescript-II KS+ and pACYC184 to obtain pBS–*cesT* and pACYC–*cesT* respectively. To create a GST–CesT fusion, the 471 bp fragment containing the *cesT* open reading frame was amplified by PCR using the primers GST–CesT (+) and GST–CesT (–), and EPEC genomic DNA as the DNA template. The resulting PCR product was digested with *Bam*HI and *Sal*I and cloned into the *Bam*HI and *Sal*I sites of pGEX-6P-1 to obtain pGEX–*cesT*.

### *Construction of Tir–HSV derivatives*

Plasmid pTir, which contains 143 bp of *tir* 5' flanking region and the *tir*–HSV gene, was generated by removing a 1.4 kbp *Hind*III–*Nsi*I fragment from pMS50 (Table 1). To construct deletion derivatives in *tir*, inverse PCR was carried out

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strain/Plasmid	Genotypes	Comments	References
<i>Strain</i>			
EPEC	Nal <sup>r</sup>	Prototypic O127:H6 EPEC E2348/69 strain	(Kenny <i>et al.</i> , 1997)
EPEC $\Delta$ tir	EPEC $\Delta$ tir, Nal <sup>r</sup>	Non-polar mutation in <i>tir</i>	(Kenny <i>et al.</i> , 1997)
AAF006	EPEC $\Delta$ cesT, Nal <sup>r</sup>	Non-polar mutation in <i>cesT</i>	This study
SM10 $\lambda$ pir	<i>thi thr leu tonA lacY supE resA::RP4-2-Tc::Mu Km</i>	Permissive strain for replication of pCVD442	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>E. coli</i> BL21	<i>dcm ompT hsdS gal</i>	Strain for pGEX series	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>dcm ompT hsdS gal</i> $\lambda$ (DE3)	Strain for pET series	Stratagene
<i>Plasmid</i>			
pCVD450	<i>par</i> , Cm <sup>r</sup>	pACYC184 containing EPEC <i>par</i> regulon	(Gomez-Duarte and Kaper, 1995)
pBS-cesT	<i>cesT</i> , Amp <sup>r</sup>	1.6 kbp PCR fragment of <i>cesT</i> cloned into pBluescript	This study
pACYC-cesT	<i>cesT</i> , Cm <sup>r</sup>	1.6 kbp PCR fragment of <i>cesT</i> cloned into pACYC184	This study
pCVD- $\Delta$ cesT	$\Delta$ cesT, Amp <sup>r</sup>	1.5 kbp DNA fragment containing <i>cesT</i> mutation cloned into pCVD442	This study
pGEX-cesT	GST- <i>cesT</i> , Amp <sup>r</sup>	471 bp PCR fragment of <i>cesT</i> cloned into pGEX-6P-1	This study
pET-tir/cesT	His/T7 <i>tir</i> , <i>cesT</i> , Kan <sup>r</sup>	2.4 kbp PCR fragment including <i>tir</i> and <i>cesT</i> cloned into pET28.	Unpublished
pTir	<i>tir</i> -HSV, Cm <sup>r</sup>	Tir-HSV fusion gene cloned into pACYC184	This study
pTir- $\Delta$ IBD	Truncated <i>tir</i> , Cm <sup>r</sup>	pTir derivative lacking the IBD	This study
pTir- $\Delta$ 1	Truncated <i>tir</i> , Cm <sup>r</sup>	pTir derivative containing Tir (1-200)-HSV	This study
pTir- $\Delta$ 2	Truncated <i>tir</i> , Cm <sup>r</sup>	pTir derivative containing Tir (200-555)-HSV	This study
pTir- $\Delta$ 3	Truncated <i>tir</i> , Cm <sup>r</sup>	pTir derivative containing Tir (1-150)-HSV	This study
pTir- $\Delta$ 4	Truncated <i>tir</i> , Cm <sup>r</sup>	pTir derivative containing Tir (1-100)-HSV	This study
pTir- $\Delta$ 5	Truncated <i>tir</i> , Cm <sup>r</sup>	pTir derivative containing Tir (1-50)-HSV	This study
pMS50	<i>orf19</i> , <i>tir</i> -HSV, Cm <sup>r</sup>	3.2 kbp DNA fragment of <i>orf19</i> and <i>tir</i> -HSV cloned into pACYC184	(Kenny <i>et al.</i> , 1997)
pTIR553	<i>tir</i> - <i>cat</i> fusion, Amp <sup>r</sup>	pKK232 derivative containing a <i>tir</i> - <i>cat</i> transcription fusion	C. Sánchez-SanMartín, unpublished
pCVD442	<i>sacB</i> , R6K replicon, Amp <sup>r</sup>	Positive-selection suicide vector	(Donnenberg and Kaper, 1991)
pGEX-6P-1	GST gene, Amp <sup>r</sup>	GST gene fusion vector	Pharmacia
pET28	His/T7-tagged gene, Kan <sup>r</sup>	His/T7-tagged fusion vector	Novagen
pBluescript-II SK+	Amp <sup>r</sup>	Cloning vector	Stratagene
pACYC184	Cm <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	Cloning vector	(Rose, 1988)

using primers containing a *Bam*HI or *Stu*I restriction site (Table 2, T9 and  $\Delta$ tir primer series) using circular pTir as the DNA template. The PCR product was then digested with *Bam*HI or *Stu*I, then self-ligated to obtain pTir- $\Delta$  series (Fig. 6). The combinations of primers used to construct the pTir- $\Delta$  series are as follows: pTir- $\Delta$ IBD, T9 (-) and T9 (+); pTir- $\Delta$ 1,  $\Delta$ tir001 (-) and  $\Delta$ tir 001 (+); pTir- $\Delta$ 2,  $\Delta$ tir002 (-) and  $\Delta$ tir 002 (+); pTir- $\Delta$ 3,  $\Delta$ tir003 (-) and  $\Delta$ tir 001 (+); pTir- $\Delta$ 4,  $\Delta$ tir004 (-) and  $\Delta$ tir 001 (+); pTir- $\Delta$ 5,  $\Delta$ tir005 (-) and  $\Delta$ tir 001 (+).

#### Construction of a non-polar mutation in EPEC *cesT*

To construct a non-polar mutation in *cesT*, inverse PCR was carried out using the inv-cesT (-) and inv-cesT (+) primers containing a *Bgl*II restriction site using circular pBS-cesT as the DNA template. The PCR product was then digested with *Bgl*II and self-ligated to obtain pBS- $\Delta$ cesT. The resulting plasmid contained the *Bgl*II restriction site in addition to a 103 bp deletion starting 16 bp downstream from the *cesT* start codon. The 1.5 kbp *Sal*I-SacI DNA fragment containing the *cesT* mutation was excised from pBS- $\Delta$ cesT and inserted into the same sites of pCVD442 to obtain pCVD- $\Delta$ cesT. The

resulting plasmid was transformed into *E. coli* SM10 $\lambda$ pir and trans conjugated into the EPEC nalidixic resistant strain as described before (Donnenberg and Kaper, 1991). To confirm the deletion in *cesT*, chromosomal DNA was prepared from the mutant strain and PCR was performed with cesT (+) and cesT (-) primers encompassing the *cesT* gene. The resulting PCR products were digested with *Bgl*II to confirm the presence of this engineered restriction site and the deletion. The resulting mutant strain was designated as EPEC  $\Delta$ cesT (strain AAF006).

#### Infection of cultured cells and immunofluorescence microscopy

HeLa cells (10<sup>6</sup>) were seeded and grown overnight on 12 mm round glass coverslips, then infected with EPEC or its mutant strains for 3 h. Cells were washed three times with PBS and fixed with 3.0% paraformaldehyde in PBS (pH 7.2), then washed three times with PBS. The fixed cells were permeabilized with 20  $\mu$ l of 0.1% Triton X-100 in PBS in the presence of phalloidin-Texas red (to stain filamentous actin) or anti-phosphotyrosine antibodies (4G10, UBI). Alexa-conjugated anti-mouse-IgG and IgM (Molecular probes) was used as the

Table 2. PCR primers used in this study

Designation <sup>a</sup>	Sequence <sup>b</sup>	Primer description and location <sup>c</sup>
cesT (+)	<u>CGCGGATCC</u> AGACAGCAGGCTGTTGAAAGCAAT <i>Bam</i> HI	5' flanking region of <i>cesT</i> (-794 to -771)
cesT (-)	CGCGT <u>CGAC</u> CAAATCGTCGATAAATTAATATCT <i>Sal</i> I	3' flanking region of <i>cesT</i> (770-793)
GST-cesT (+)	CGCGGATCCATGTCATCAAGATCTGAACTTTTA <i>Bam</i> HI	<i>cesT</i> primer (1-24) for GST fusion
GST-CesT (-)	CGCGT <u>CGACT</u> TATCTTCCGGCGTAATAATGTTT <i>Sal</i> I	<i>cesT</i> primer (448-471) for GST fusion
inv-cesT (-)	GAAGATCTTGATGACATATAATTTCTCT <i>Bgl</i> II	Inverse PCR primer for mutation in <i>cesT</i> (-12 to 15)
inv-cesT (+)	GAAGATCTCGTTATCTGATGCCAATGACG <i>Bgl</i> II	Inverse PCR primer for mutation in <i>cesT</i> (119-139)
T9 (-)	GGG <u>GAGGCCT</u> TGTAGGATCATCCGGTCCGG <i>Stu</i> I	Inverse PCR primer for deletion in IBD of <i>tir</i> (781-801)
T9 (+)	GGG <u>GAGGCCT</u> CAGCATGCCAGACGTCAGGAG <i>Stu</i> I	Inverse PCR primer for deletion in IBD in <i>tir</i> (1048-1068)
Δtir001 (+)	CGGGATCCGCTAGCCAGCCAGAACTCGCCCCGG <i>Bam</i> HI	Inverse PCR primer for C-terminal deletion <i>tir</i> (HSV epitope region)
Δtir001 (-)	CGGGATCCCGTATCAACGTCCTTGGGTGACGT <i>Bam</i> HI	Inverse PCR primer for C-terminal deletion <i>tir</i> (576-600)
Δtir002 (+)	CGGGATCCCGTCTGTTGGTGTGGCAGCGCTT <i>Bam</i> HI	Inverse PCR primer for Tir N-terminal deletion (601-625)
Δtir002 (-)	CGGGATCCCATACATATATCCTTTTATTAGAA <i>Bam</i> HI	Inverse PCR primer for C-terminal deletion in <i>tir</i> (-22 to 3)
Δtir003 (-)	CGGGATCCACCCTCAGTATCAATAGATTGCAAG <i>Bam</i> HI	Inverse PCR primer for C-terminal deletion in <i>tir</i> (426-450)
Δtir004 (-)	CGGGATCCAATATCAAGTGGCCCTTATCATGG <i>Bam</i> HI	Inverse PCR primer for C-terminal deletion in <i>tir</i> (276-300)
Δtir005 (-)	CGGGATCCAAACAATGAACGAGATCCTAATGCT <i>Bam</i> HI	Inverse PCR primer for C-terminal deletion in <i>tir</i> (126-150)

a. Oligonucleotides corresponding to + or - DNA strands are represented by (+) and (-).

b. Restriction sites are underlined.

c. The location of primers are given with respect to the start codon of the gene.

secondary antibody for anti-phosphotyrosine. Stained samples were visualized and photographed as described elsewhere (Finlay *et al.*, 1991).

#### Cellular fractionation and immunoblotting

Cultured HeLa cells ( $5 \times 10^5$  per 60 mm dish) were infected with either EPEC wild type,  $\Delta tir$ ,  $\Delta cesT$  or  $\Delta cesT/cesT$  strains for 3.5 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Cells were fractionated as previously described (Kenny *et al.*, 1997) and the Triton X-100 soluble membrane fraction was resolved by 8% SDS-PAGE, and proteins were transferred to nitrocellulose for immunoblotting with monoclonal anti-Tir (clone 2F12) and anti-EspB (clone 2A11) antisera.

#### Preparation of secreted proteins

To prepare EPEC-secreted proteins, bacterial overnight cultures were diluted 1:50 into DMEM and incubated for 6 h in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Bacteria were removed by centrifugation (18000 × g, 10 min), and the supernatant was precipitated by addition of 10% ice-cold trichloroacetic acid (TCA), and incubated on ice for 1 h. After centrifugation, the pellets were resuspended in Laemmli sample buffer and analysed by 12% SDS-PAGE. For maximal secretion of Tir, overnight culture of EPEC or its derivatives containing pCVD450 were

diluted 1:20 into LB media and incubated for 3 h at 37°C with shaking. Bacteria were collected by centrifugation and the pellets were resuspended in M9 media containing 44 mM NaHCO<sub>3</sub>, then incubated for 4 h in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Bacteria were removed by centrifugation and precipitated by TCA as described above.

#### CAT assay

EPEC and its mutant strains carrying the *tir-cat* fusion in plasmid pTIR553 (C. Sánchez-SanMartin and J. L. Puente, unpublished) were grown in DMEM at 37°C, and cultured samples were collected during late exponential phase (OD<sub>600</sub> of 0.8-1.0). The chloramphenicol acetyltransferase assay was performed as previously described (Puente *et al.*, 1996).

#### RNA slot blot hybridization.

Total RNA was isolated from culture samples of bacterial strains grown in DMEM at 37°C to an OD<sub>600</sub> of  $\approx 0.6$ , using a RNAsy kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Denatured total RNA (10 μg) was blotted onto nylon membranes (Boehringer) using a PR600 slot blot apparatus (Hoefer Scientific Instruments). The nylon membranes were incubated for 3 h at 42°C in a prehybridization solution

containing 20% formamide,  $6\times$ SSC,  $2\times$ Denhardt's solution and  $200\ \mu\text{g ml}^{-1}$  of salmon sperm DNA. Hybridization was carried out during 14 h at  $42^\circ\text{C}$  in fresh solution containing one of the specific probes, which were radioactively labelled with [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-dCTP using a multiprime DNA labelling system (Amersham Life Science). The membranes were washed two times with  $2\times$ SSC/0.1% SDS, and two times with  $0.2\times$ SSC/0.1% SDS for 15 min at  $42^\circ\text{C}$ , dried and subjected to autoradiography. The DNA probes corresponding to the internal coding region of *tir* and of the ribosomal 16S rRNA gene were generated by PCR or by gel purifying the appropriate restriction fragments.

#### GST fusion proteins

Glutathione S-transferase (GST)–CesT fusion and GST were expressed and purified by glutathione–agarose beads as described elsewhere (Smith, 1993). GST–CesT fusion and GST proteins bound to agarose beads were used for the GST pulldown assay. For affinity blotting, proteins bound to glutathione–agarose beads were eluted by addition of 50 mM Tris HCl (pH 8.0), 10 mM reduced glutathione. After centrifugation, supernatants were used for the affinity blotting.

#### Gel overlay blotting

EPEC-secreted proteins were prepared from culture supernatants from EPEC and Tir mutant strains containing pCVD450 (encoding *per* regulon) by TCA precipitation. Samples were resolved by 12% SDS–PAGE and transferred to nitrocellulose filter, then incubated overnight in TBS containing 4% bovine serum albumin at  $4^\circ\text{C}$ . Purified GST–CesT fusion and GST proteins were used as protein probes, and were incubated with the nitrocellulose filter-immobilized secreted proteins, then washed. Interaction of CesT and secreted proteins on the nitrocellulose filter was detected by a polyclonal GST antibody followed by goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (1:1000) using the NBT/BCIP solution. All incubations were performed in 5% skimmed milk in PBS, 0.1% Tween-20 for 2 h at room temperature and washings were twice for 15 min in PBS, 0.1% Tween-20.

#### Preparation of bacterial whole-cell extract

EPEC  $\Delta$ *tir* carrying different Tir–HSV derivatives was incubated overnight at  $37^\circ\text{C}$  with shaking and the overnight cultures were diluted 1:10 into LB broth and incubated for 3 h with shaking. Bacteria were collected by centrifugation ( $18\ 000\times g$ , 10 min) and pellets were suspended in cold binding buffer (50 mM potassium phosphate, 150 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ). Bacterial suspensions were sonicated and cell debris was removed by centrifugation ( $18\ 000\times g$ , 30 min). Triton X-100 and glycerol were added in supernatants at the final concentration of 1% and 10% and protein concentration of the EPEC whole-cell extracts was adjusted to  $10\ \text{mg ml}^{-1}$  with cold bead-binding buffer and then used for GST pulldown assay.

#### GST pulldown assay

The GST–CesT fusion protein bound to glutathione beads ( $20\ \mu\text{g}$ ) were incubated with 0.5 ml of bacteria whole-cell extract for 4 h at  $4^\circ\text{C}$  with gentle shaking. Supernatants were removed by centrifugation and beads were washed three times in bead-binding buffer. After final wash, supernatants were removed and  $40\ \mu\text{l}$  of  $2\times$ SDS sample buffer was added to each sample. Samples were boiled for 5 min, then resolved by 12% SDS–PAGE and transferred to nitrocellulose filter. The filter was incubated overnight in TBS containing 4% bovine serum albumin at  $4^\circ\text{C}$ . Tir tagged with HSV epitope was detected by an anti-HSV monoclonal antibody (1:5000, Novagen) followed by goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (1:1000) using the NBT/BCIP solution. All incubations were performed in 1% BSA in TBS for 1 h at room temperature and washings were five times for 5 min in TBS, 0.1% Tween-20.

#### Purification of Tir–CesT complex by gel filtration

An overnight culture of *E. coli* BL21 (DE3) strain carrying pET–*tir/cesT* was diluted 1:100 in LB media and incubated at  $37^\circ\text{C}$  with shaking. IPTG was added at a final concentration of 0.5 mM when an  $\text{OD}_{600}$  of 0.6 was reached. After 2 h of induction, bacterial pellets were collected by centrifugation and frozen at  $-80^\circ\text{C}$ . The thawed cells were resuspended in 50 mM HEPES (pH 7.5), 300 mM NaCl. A cell lysate was prepared with a French press and clarified by centrifugation for 20 min at  $10\ 000\times g$ . The resulting lysate was bound to nickel–NTA resin by stirring for 20 min. The sample was applied on a column and washed with 50 mM HEPES (pH 7.5), 300 mM NaCl. Then the column was further washed with 50 mM HEPES (pH 7.5), 300 mM NaCl, 50 mM imidazole. A gradient from 50 to 500 mM imidazole was run to elute the bound Tir from the column (it elutes around 250–300 mM imidazole). The resulting elution sample was applied to a superdex 200 HR 10/30 gel filtration column (Pharmacia) equilibrated in 50 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl at  $0.5\ \text{ml min}^{-1}$  on an Akta purifier HPLC.

#### Acknowledgements

The authors thank Annick Gauthier for critical reading of this manuscript and helpful discussions. This work was supported by operating grants from the Medical Research Council of Canada and a Howard Hughes International Research Scholar Award (to B.B.F.), and by the Canadian Bacterial Diseases Network of Excellence and the B. C. Health Research Foundation (to N.C.J.), and the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN230398 to J.L.P.). M.G. was supported by a postdoctoral fellowship from the Basque Government (Spain). J.L.P. was supported by a sabbatical fellowship from DGAPA and CONACyT. B.B.F. is a MRC Scientist.

#### References

- Abe, A., Heczko, U., Hegele, R.G., and Finlay, B.B. (1998) Two enteropathogenic *Escherichia coli* Type III secreted proteins, EspA and EspB, are virulence factors. *J Exp Med* **188**: 1907–1916.

- An, H.Y., Fairbrother, J.M., Dubreuil, J.D., and Harel, J. (1997) Cloning and characterization of the *eae* gene from a dog attaching and effacing *Escherichia coli* strain 4221. *FEMS Microbiol Lett* **148**: 239–244.
- Anderson, D.M., and Schneewind, O. (1997) A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *Science* **278**: 1140–1143.
- Beaudry, M., Zhu, C., Fairbrother, J.M., and Harel, J. (1996) Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *J Clin Microbiol* **34**: 144–148.
- Cantey, J.R., Lushbaugh, W.B., and Inman, L.R. (1981) Attachment of bacteria to intestinal epithelial cells in diarrhea caused by *Escherichia coli* strain RDEC-1 in the rabbit: stages and role of capsule. *J Infect Dis* **143**: 219–230.
- Cheng, L.W., Anderson, D.M., and Schneewind, O. (1997) Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **24**: 757–765.
- Cornelis, G.R., and Wolf-Watz, H. (1997) The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **23**: 861–867.
- Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1991) Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* **59**: 4310–4317.
- Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1992) Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **60**: 3953–3961.
- Donnenberg, M.S., Yu, J., and Kaper, J.B. (1993) A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J Bacteriol* **175**: 4670–4680.
- Elliott, S.J., Wainwright, L.A., McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Deng, Y.K., Lai, L.C., McNamara, B.P., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* **28**: 1–4.
- Finlay, B.B., Ruschkowski, S., and Dedhar, S. (1991) Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. *J Cell Sci* **99**: 283–296.
- Finlay, B.B., Rosenshine, I., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1992) Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. *Infect Immun* **60**: 2541–2543.
- Foubister, V., Rosenshine, I., Donnenberg, M.S., and Finlay, B.B. (1994) The *eaeB* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* is necessary for signal transduction in epithelial cells. *Infect Immun* **62**: 3038–3040.
- Francis, D.H., Collins, J.E., and Duimstra, J.R. (1986) Infection of gnotobiotic pigs with an *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with an outbreak of hemorrhagic colitis. *Infect Immun* **51**: 953–956.
- Frankel, G., Candy, D.C., Everest, P., and Dougan, G. (1994) Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infect Immun* **62**: 1835–1842.
- Frankel, G., Phillips, A.D., Novakova, M., Field, H., Candy, D., Schauer, D.B., Douce, G., and Dougan, G. (1996) Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* restores murine virulence to a *Citrobacter rodentium eaeA* mutant – induction of an immunoglobulin a response to intimin and EspB. *Infect Immun* **64**: 5315–5325.
- Gomez-Duarte, O.G., and Kaper, J.B. (1995) A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**: 1767–1776.
- de Grado, M., Abe, A., Gauthier, A., Steele-Mortimer, O., DeVinney, R., and Finlay, B.B. (1999) Identification of the intimin binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Cell Microbiol* **1**: 7–17.
- Hall, G.A., Dorn, C.R., Chanter, N., Scotland, S.M., Smith, H.R., and Rowe, B. (1990) Attaching and effacing lesions in vivo and adhesion to tissue culture cells of Vero-cyto-toxin-producing *Escherichia coli* belonging to serogroups O5 and O103. *J Gen Microbiol* **136**: 779–786.
- Helie, P., Morin, M., Jacques, M., and Fairbrother, J.M. (1991) Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing *Escherichia coli* O45:K\*E65\* strain. *Infect Immun* **59**: 814–821.
- Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379–433.
- Iriarte, M., and Cornelis, G.R. (1998) YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* **29**: 915–929.
- 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 putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7996–8000.
- Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D., and Kaper, J.B. (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7839–7843.
- 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-gamma-1. *Infect Immun* **65**: 2528–2536.
- Kenny, B., Lai, L.C., Finlay, B.B., and Donnenberg, M.S. (1996) EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol Microbiol* **20**: 313–323.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A., and Finlay, B.B. (1997) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**: 511–520.
- Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M.J., Nisan, J., 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.
- Kumamoto, C.A. (1991) Molecular chaperones and protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. *Mol Microbiol* **5**: 19–22.
- 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.
- Licois, D., Reynaud, A., Federighi, M., Gaillard-Martinie, B., Guillot, J.F., and Joly, B. (1991) Scanning and transmission electron microscopic study of adherence of *Escherichia coli* O103 enteropathogenic and/or enterohemorrhagic strain GV in enteric infection in rabbits. *Infect Immun* **59**: 3796–3800.
- McDaniel, T.K., and Kaper, J.B. (1997) A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* **23**: 399–407.
- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1664–1668.
- McNamara, B.P., and Donnenberg, M.S. (1998) A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic *Escherichia coli* via the type III export pathway. *FEMS Microbiol Lett* **166**: 71–78.
- Miller, C.G., Strauch, K.L., Kukral, A.M., Miller, J.L., Wingfield, P.T., Mazzei, G.J., Werlen, R.C., Graber, P., and Movva, N.R. (1987) N-terminal methionine-specific peptidase in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 2718–2722.
- Moon, H.W., Whipp, S.C., Argenzio, R.A., Levine, M.M., and Giannella, R.A. (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* **41**: 1340–1351.
- Neyt, C., and Cornelis, G.R. (1999) Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol Microbiol* **31**: 143–156.
- Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W., and Schoolnik, G.K. (1996) The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcription regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* **20**: 87–100.
- Rose, R.E. (1988) The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res* **16**: 355.
- 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.
- Rosqvist, R., Hakansson, S., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1995) Functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of *Yersinia*, *Salmonella* and *Shigella*. *EMBO J* **14**: 4187–4195.
- Schauer, D.B., and Falkow, S. (1993) Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect Immun* **61**: 2486–2492.
- Simon, R., Priefer, U., and Puhler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784–791.
- Smith, D.B. (1993) Purification of glutathione-S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Methods Mol Cell Biol* **4**: 220–229.
- Takeuchi, A., Inman, L.R., O'Hanley, P.D., Cantey, J.R., and Lushbaugh, W.B. (1978) Scanning and transmission electron microscopic study of *Escherichia coli* O15 (RDEC-1) enteric infection in rabbits. *Infect Immun* **19**: 686–694.
- 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.
- Tzipori, S., Karch, H., Wachsmuth, K.I., Robins-Browne, R.M., O'Brien, A.D., Lior, H., Cohen, M.L., Smithers, J., and Levine, M.M. (1987) Role of a 60-megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*, **55**: 3117–3125.
- Tzipori, S., Wachsmuth, K.I., Smithers, J., and Jackson, C. (1988) Studies in gnotobiotic piglets on non-O157:H7 *Escherichia coli* serotypes isolated from patients with hemorrhagic colitis. *Gastroenterology* **94**: 590–597.
- Wachter, C., Beinke, C., Mattes, S.M., and Schmidt, M.A. (1999) Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **31**: 1695–1707.
- Wainwright, L.A., and Kaper, J.B. (1998) EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **27**: 1247–1260.
- Wattiau, P., Bernier, B., Deslee, P., Michiels, T., and Cornelis, G.R. (1994) Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10493–10497.
- Wattiau, P., Woestyn, S., and Cornelis, G.R. (1996) Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol* **20**: 255–262.
- Woestyn, S., Sory, M.P., Boland, A., Lequenne, O., and Cornelis, G.R. (1996) The cytosolic SycE and SycH chaperones of *Yersinia* protect the region of YopE and YopH involved in translocation across eukaryotic cell membranes. *Mol Microbiol* **20**: 1261–1271.
- 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.
- Wood, M.W., Rosqvist, R., Mullan, P.B., Edwards, M.H., and Galgov, E.E. (1996) SopE, a secreted protein of *Salmonella dublin*, is translocated into the target eukaryotic cell via a sip-dependent mechanism and promotes bacterial entry. *Mol Microbiol* **22**: 327–338.
- Zhu, C., Harel, J., Jacques, M., Desautels, C., Donnenberg, M.S., Beaudry, M., and Fairbrother, J.M. (1994) Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect Immun* **62**: 4153–4159.