



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**“ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL  
OPERÓN *ecp* DE *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA Y *E. coli*  
ENTEROHEMORRÁGICA”**

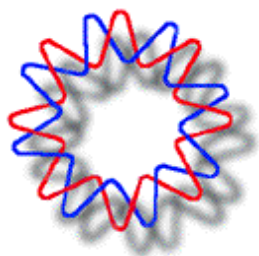
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

**M. en C. Verónica Irazú Martínez Santos**



**Director de tesis: Dr. José Luis Puente García**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

---

---

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. José Luis Puente García. Durante la realización del trabajo fui becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con No. de registro 166620, por el período de febrero del 2007 a enero del 2010.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dra. Alicia González Manjarrez

Dr. Mario Soberón Chávez

Dr. José Luis Puente García

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Dr. Joel Osuna Quintero

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

Dr. Daniel Segura

Dra. Rosa María Gutiérrez

---

---

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, especialmente a mis papás y mi hermano por estar siempre conmigo apoyándome.

A los Drs. José Luis Puente y Edmundo Calva por darme un lugar en su laboratorio desde la licenciatura. Especialmente al Dr. José Luis Puente por confiar en mi al aceptarme en su grupo y ser mi tutor no sólo de licenciatura sino también de pos-grado, por su paciencia y apoyo en momentos de crisis. A Ale Vázquez y Abraham por su ayuda con los experimentos y construcción de cepas. A los EPECos y Salmonellos: Pancho, Carmen, Víctor, Magdalena, Irene, Ramón, Sara, Alejandro, Crispín, Marcos, Nayelli, Esteban, Noé, Lilí, Ismael, Ricardo, Carmen, José Miguel, Claudia por su amistad y por hacer del lab un lugar agradable para trabajar. A Amapola y Rosalva por su amistad y ayuda con trámites y papeleo. A Rebeca y José Luis por su apoyo en la preparación del material.

Al Dr. Jorge Girón por darme la oportunidad de hacer una estancia en su laboratorio y aprender cosas nuevas.

A mi comité tutorial, los Drs. Alicia González y Mario Soberón por su tiempo y sus sugerencias.

A los miembros del jurado: Dr. Guillermo Gosset, Dr. Joel Osuna, Dr. Miguel Ángel Cevallos, Dr. Daniel Segura y Dra. Rosa María Gutiérrez por la revisión de la tesis.

---

---

## ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABLAS.....	ixx
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii

### Capítulo I

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Escherichia coli</i> .....	1
1.2 <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena y Enterohemorrágica.....	3
1.3 <i>Citrobacter rodentium</i> .....	4
1.4 Adherencia.....	6
1.5 Fimbrias.....	8
1.6 Clasificación.....	9
1.7 Tipos de fimbrias.....	10
1.8 Mecanismos de biogénesis.....	13
1.9 Regulación de operones fimbriales.....	21
1.10 Dominio EAL.....	23
1.11 c-di-GMP.....	23
1.12 Familia LuxR.....	24
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>26</b>
2.1 “ <i>Escherichia coli</i> common pilus” (ECP).....	26
2.2 Operón <i>ecp</i> .....	27
2.3 Operón <i>ecp</i> en <i>C. rodentium</i> .....	29
2.4 Importancia de ECP.....	30
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>32</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
5.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	33
5.2 Oligonucleótidos.....	38
5.3 Construcción de cepas mutantes y etiquetadas.....	44
5.4 Construcción de fusiones transcripcionales.....	45
5.5 Ensayo de actividad de CAT.....	46
5.6 Construcción de plásmidos.....	47
5.7 Mutagénesis sitio-dirigida.....	48
5.8 Citometría de flujo.....	49
5.9 Purificación de RNA.....	49

5.10	Determinación del inicio de transcripción por “primer extension” .....	50
5.11	“Western blot” .....	50
5.12	“Footprinting <i>in vivo</i> ” .....	51
5.13	Purificación de la proteína H-NS-MH .....	52
5.14	Ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSAs) .....	53
5.15	“Pull down” .....	53
5.16	Microscopía inmuno-electrónica .....	54
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
6.1	El cluster <i>ecp</i> se transcribe como operón .....	55
6.2	Identificación del sitio de inicio de la transcripción .....	56
6.3	La expresión de <i>ecp</i> es similar en EPEC y EHEC .....	59
6.4	EcpR regula de manera positiva la expresión de <i>ecp</i> .....	60
6.5	Mutaciones en el HTH afectan la actividad de EcpR .....	61
6.6	La región reguladora de <i>ecp</i> contiene varios elementos reguladores .....	64
6.7	EcpR se une a dos secuencias TTCCT repetidas directas .....	66
6.8	Mutaciones en la caja RcsB o en una secuencia repetida invertida no afectan la actividad de EcpR.....	70
6.9	IHF y H-NS regulan la expresión del operón <i>ecp</i> .....	72
6.10	Expresión de EcpA en cepas de <i>E. coli</i> de laboratorio.....	75
6.11	IHF y H-NS se unen sobre la región reguladora de <i>ecp</i> .....	77
6.12	IHF desplaza a H-NS.....	79
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>80</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>85</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>86</b>

## Capítulo II

<b>10. IDENTIFICACIÓN DE UN ELEMENTO ATENUADOR EN LA REGIÓN INTERGÉNICA ENTRE <i>ecpR</i> y <i>ecpA</i></b> .....	<b>87</b>
10.1 La región intergénica contiene un elemento atenuador .....	87
10.2 Recortes de la región intergénica eliminan el efecto atenuador.....	88
10.3 El efecto atenuador no se debe a la formación de una estructura secundaria .....	90

## Capítulo III

<b>11. ANÁLISIS DE LA BIOGÉNESIS DE LA FIMBRIA ECP EN <i>Escherichia coli</i> ENTEROPATÓGENA</b> .....	<b>92</b>
11.1 Todos los genes del operón son necesarios para la expresión de EcpA.....	92
11.2 Las mutaciones introducidas no tienen un efecto polar sobre los genes corriente abajo .....	93
11.3 Construcción de cepas etiquetadas .....	94
11.4 EcpA-MH interactúa con EcpD-FLAG .....	95
11.5 EcpD forma parte de la estructura de la fimbria .....	97
11.6 Discusión .....	99

---

---

## Capítulo IV

### 12. ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL OPERÓN *ecp* EN

<b><i>Citrobacter rodentium</i></b> .....	101
<b>12.1</b> El anticuerpo anti-ECP de EHEC no reconoce a EcpA de <i>C. rodentium</i> .....	101
<b>12.2</b> <i>C. rodentium</i> expresa a EcpA pero no a EcpR.....	102
<b>12.3</b> EcpR no regula la expresión de EcpA.....	103
<b>12.4</b> ROD_29251 y FimK regulan de manera positiva la expresión de <i>ecp</i> .....	104
<b>12.5</b> IHF regula de manera positiva la expresión de <i>ecp</i> .....	105
<b>12.6</b> Discusión y Conclusiones.....	106
<b>13. Bibliografía</b> .....	108
<b>14. Anexo I</b> .....	120

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C- grados centígrados  
aa- amino ácidos  
Ap- ampicilina  
Cm- cloramfenicol  
DMS- dimetil sulfato  
g- gramos  
hr- hora  
Ig- inmunoglobulina  
kDa- Kilo Daltones  
Km- kanamicina  
M- molar  
mDa- Mega Daltones  
min- minuto  
ml- mili litros  
mM- mili molar  
Nal- ácido nalidíxico  
ng- nano gramos  
nm- nanómetros  
pb- pares de bases  
pp- páginas  
rpm- revoluciones por minuto  
Sm- estreptomycinina  
spp- especies  
V- voltz  
 $\mu$ g- micro gramos  
 $\mu$ l- micro litros  
 $\mu$ m- micrómetros  
 $\mu$ M- micro molar



---

---

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Modelo de patogénesis de EPEC.....	4
Fig. 2. Efectos de la infección por <i>C. rodentium</i> .....	5
Fig. 3. Modelo de ensamblaje del pilus tipo IV de <i>N. gonorrhoeae</i> .....	14
Fig. 4. Modelo del ensamblaje de curli por la vía de nucleación-precipitación extracelular.....	14
Fig. 5. Modelo de ensamblaje del pilus P por la vía chaperona-usher.....	15
Fig. 6. Polimerización de subunidades fimbriales por complementación de la cadena donante.....	17
Fig. 7. Intercambio de cadena donante.....	18
Fig. 8. Organización de los operones fimbriales <i>pap</i> y <i>fim</i> .....	19
Fig. 9. Modelo de ensamblaje de la fimbria CS1.....	20
Fig. 10. Secuencia consenso del dominio EAL.....	24
Fig. 11. Fimbrias ECP.....	26
Fig. 12. Representación esquemática del operón <i>ecp</i> .....	28
Fig. 13. Representación esquemática del operón <i>ecp</i> de <i>C. rodentium</i> .....	29
Fig. 14. El operón <i>ecp</i> se transcribe a partir de un promotor localizado corriente arriba de <i>ecpR</i> .....	56
Fig. 15. Identificación del sitio de inicio de la transcripción de <i>ecpR</i> en EPEC.....	57
Fig. 16. Identificación del sitio de inicio de la transcripción de <i>ecpR</i> en EHEC.....	58
Fig. 17. El P2 sólo se expresa en EPEC.....	59
Fig. 18. La expresión de <i>ecp</i> es similar en EPEC y EHEC.....	60
Fig. 19. EcpR regula de manera positiva la expresión de EcpA.....	61
Fig. 20. EcpR tiene un dominio HTH de unión a DNA tipo LuxR.....	62
Fig. 21. Mutaciones en el dominio HTH de EcpR afectan la autorregulación.....	63
Fig. 22. Mutaciones en el dominio HTH afectan la actividad de EcpR.....	64
Fig. 23. Identificación de elementos reguladores involucrados en la regulación del operón <i>ecp</i> .....	65
Fig. 24. Versiones trucas de EcpR no son activas.....	67
Fig. 25. Identificación de los sitios de unión de EcpR.....	68
Fig. 26. Las cajas TTCCT son importantes para la actividad de EcpR.....	69
Fig. 27. Análisis de elementos reguladores de <i>ecp</i> por mutagénesis sitio-dirigida.....	71

---



---

<b>Fig. 28.</b> El operón <i>ecp</i> es regulado positivamente por IHF y negativamente por H-NS.....	72
<b>Fig. 29.</b> IHF es necesaria para la actividad de EcpR.....	74
<b>Fig. 30.</b> Las cepas de <i>E. coli</i> K-12 no expresan EcpA.....	75
<b>Fig. 31.</b> La sobre expresión de EcpR no activa la expresión de las cepas K12.....	76
<b>Fig. 32.</b> Alineamiento de las regiones reguladoras de <i>ecp</i> de EPEC E2348/69 y <i>E. coli</i> K12 MG1655 y W3110.....	77
<b>Fig. 33.</b> IHF y H-NS se unen a la región reguladora del operón <i>ecp</i> .....	78
<b>Fig. 34.</b> IHF desplaza a H-NS.....	79
<b>Fig. 35.</b> Modelo propuesto de la regulación del operón <i>ecp</i> .....	85
<b>Fig. 36.</b> Identificación de un elemento atenuador en la región intergénica.....	88
<b>Fig. 37.</b> Recortes de la región intergénica eliminan el efecto atenuador.....	89
<b>Fig. 38.</b> El efecto atenuador es independiente de EcpR.....	90
<b>Fig. 39.</b> La eliminación de la estructura secundaria no aumenta la expresión.....	91
<b>Fig. 40.</b> Mutaciones en los genes <i>ecp</i> afectan la expresión de EcpA.....	92
<b>Fig. 41.</b> Expresión de las proteínas etiquetadas.....	95
<b>Fig. 42.</b> Interacción entre las proteínas Ecp.....	96
<b>Fig. 43.</b> Homología entre el N-terminal de EcpA y EcpD.....	97
<b>Fig. 44.</b> Análisis de la producción de ECP en cepas de EPEC E2348/69 por microscopía inmunomarcaje con oro coloidal y microscopía electrónica.....	98
<b>Fig. 45.</b> Modelos de formación de fimbrias ECP.....	100
<b>Fig. 46.</b> El anticuerpo de EHEC no reconoce a la proteína de <i>C. rodentium</i> .....	101
<b>Fig. 47.</b> Expresión de EcpA y EcpR.....	102
<b>Fig. 48.</b> EcpR no se expresa en <i>C. rodentium</i> .....	103
<b>Fig. 49.</b> FimK y ROD_29251 regulan la expresión de <i>ecp</i> .....	104
<b>Fig. 50.</b> IHF es un regulador positivo de <i>ecp</i> .....	105

---

---

## LISTA DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Cepas de <i>E. coli</i> patógenas para humanos.....	2
<b>Tabla 2.</b> Adhesinas fimbriales de EHEC.....	7
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de identidad entre las proteínas ECP de EPEC, EHEC y <i>C. rodentium</i> .....	30
<b>Tabla 4.</b> Cepas y plásmidos utilizados.....	33
<b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos utilizados.....	38
<b>Tabla 6.</b> Caracterización de los plásmidos utilizados para complementación y “pull down”.....	93

---

---

## RESUMEN

*Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC) y *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) son patógenos diarreogénicos clínicamente importantes que se adhieren a la superficie del epitelio intestinal. Las fimbrias ECP (*E. coli* “common pilus”) están codificadas en un operón formado por 6 genes denominado *ecp* y son producidas por cepas tanto patógenas como no patógenas de *E. coli*. Otras bacterias como *Citrobacter rodentium* y *Klebsiella pneumoniae* poseen ortólogos de este operón. En EPEC y EHEC el primer gen del operón codifica para EcpR, una proteína reguladora que contiene un dominio HTH de unión a DNA C-terminal parecido al de la familia LuxR. De acuerdo con este dato, una mutante en *ecpR* produce muy bajos niveles de la fimbria, así como de la subunidad principal EcpA, mientras que mutantes en amino ácidos conservados entre la familia LuxR en el dominio HTH pierden la capacidad de activar la expresión del promotor de *ecp*. El análisis detallado del papel de EcpR reveló que regula positivamente al operón *ecp* uniéndose a secuencias repetidas (TTCCT) localizadas entre las posiciones -211 y -185 con respecto al sitio de inicio de la transcripción de *ecpR*, autorregulando de esta manera su propia expresión y, por lo tanto, aumentando la expresión de los genes *ecp* y con ello la producción de ECP. Además, H-NS reprime la transcripción de *ecp* uniéndose a una secuencia localizada corriente arriba del promotor de *ecp*, mientras que IHF contrarresta la represión ejercida por H-NS uniéndose en la vecindad del sitio de unión de H-NS. IHF es esencial para la activación mediada por EcpR, pero deja de requerirse en ausencia de H-NS, indicando que su función principal es contrarrestar la represión mediada por H-NS. Se identificaron otras regiones en *cis* en la región corriente arriba del promotor, así como en la región intergénica entre *ecpR* y *ecpA* que parecen atenuar la transcripción de los genes corriente abajo de *ecpR* bajo ciertas condiciones. Contrastando con lo observado para *E. coli*, en *C. rodentium* la expresión del operón *ecp* depende de dos proteínas que contienen un dominio EAL, el cual está involucrado en la degradación del segundo mensajero GMP-di-cíclico; así como del regulador global IHF. Este trabajo provee evidencia de la interacción entre algunos reguladores globales en la regulación de un operón fimbrial con características únicas. Una de estas características es la presencia de dos probables chaperonas (EcpB y EcpE), así como de una subunidad (EcpD) que puede localizarse en la punta de la fimbria formada por la subunidad principal (EcpA) o formar estructuras por sí sola.

---

---

## ABSTRACT

Enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli* (EPEC and EHEC, respectively) are clinically important diarrheagenic pathogens that adhere to the intestinal epithelial surface. The *E. coli* common pili (ECP) are coded in an operon formed by 6 genes named *ecp* and are expressed by most pathogenic and non-pathogenic *E. coli* strains. Other bacteria, including *Citrobacter rodentium* and *Klebsiella pneumoniae*, possess an ortholog of this operon. In EPEC and EHEC the first gene of the operon encodes EcpR, a proposed regulatory protein that contains a LuxR-like C-terminal HTH DNA-binding motif. According to this data, a  $\Delta$ *ecpR* mutant produces very low levels of ECP as well as the major subunit EcpA, and EcpR mutants containing single amino acid substitutions at conserved residues in the LuxR\_C-like HTH domain are not longer able to activate the expression of the *ecp* promoter. The detailed analysis of the role of EcpR revealed that it positively regulates the *ecp* operon by binding to direct repeat sequences (TTCCT) located between positions -211 and -185 with respect to the transcriptional start site of *ecpR*, thus auto-regulating its own expression and, therefore, increasing the expression of the *ecp* genes and ECP production. In addition, transcription of *ecp* is repressed by H-NS, which binds to a sequence located upstream of the *ecp* promoter, but positively regulated by IHF, which counteracts H-NS repression by binding in the vicinity of the H-NS binding site. IHF is essential for the EcpR-mediated activation, but is not longer required in the absence of H-NS, indicating that its main function is to counteract the repression exerted by H-NS. Other *cis* regions were identified in the region upstream of the promoter, as well as in the intergenic region between *ecpR* and *ecpA* that seem to attenuate the transcription of the downstream genes under certain conditions. In contrast to what was observed for *E. coli*, in *C. rodentium* the expression of *ecp* depends on two proteins that contain an EAL domain, which is involved in the degradation of the second messenger di-c-GMP, as well as the global regulator IHF. This work provides evidence about the interplay between global regulators in the regulation of a fimbrial operon with unique features. One of these features is the presence of two putative chaperones (EcpB and EcpE), as well as a subunit (EcpD) that can be found at the tip of a structure formed by the main subunit (EcpA) or form structures on its own.

---

---

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, la cual es la más importante a nivel médico, pues agrupa a varios géneros que son patógenos intestinales de humanos (ej. *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*). Hasta hace poco, este género agrupaba a 5 especies: *E. blattae*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, *E. coli* (Farmer et al, 1985a) y *E. fergusonii* (Farmer et al, 1985b). Sin embargo, recientemente Huys y colaboradores (2003) describieron una sexta especie asociada con diarrea en niños de Bangladesh, la cual originalmente se aisló e identificó como *Hafnia alvei*, sin embargo, los estudios fenotípicos y genéticos indicaron que esta especie no pertenecía al género *Hafnia* si no a una nueva especie: *E. albertii*. De estas seis especies, *E. coli* es la de mayor importancia para el humano, ya que es la bacteria Gram-negativa anaerobia facultativa más abundante de la microbiota intestinal. Esta bacteria también coloniza de manera natural la capa mucosa del colon de varios mamíferos incluyendo al humano (Garmendia et al, 2005). En los humanos, el intestino normalmente se coloniza en las primeras 40 horas después del nacimiento. Normalmente las cepas de *E. coli* que residen de manera inocua en el lumen intestinal carecen de factores de virulencia; sin embargo, existen varias cepas patógenas que pueden provocar distintas enfermedades tanto intestinales como extraintestinales, incluyendo infección del tracto urinario, sepsis/ meningitis y diarrea (Tabla 1). Las cepas que provocan enfermedades intestinales se dividen en 6 categorías o patotipos de acuerdo a sus esquemas de patogenicidad (Tabla 1) (Kaper et al, 2004).

Entre las cepas clínicamente y epidemiológicamente importantes que provocan enfermedades intestinales en el humano se encuentran aquellas pertenecientes a los patotipos *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), ambos patógenos bacterianos no invasivos (Nataro & Kaper, 1998).

**Tabla 1.** Patotipos de *E. coli* patógenas para humanos.

CATEGORIA	SÍNTOMAS CLÍNICOS	HOSPEDEROS	FACTORES DE PATOGENICIDAD
<b>INTESTINALES</b>			
ETEC <i>(E. coli</i> enterotoxigénica)	Diarrea acuosa (diarrea del viajero) generalmente sin sangre, moco o pus, de intensidad variable. Puede haber fiebre y vómito.	Bebés recién destetados y adultos de países donde la enfermedad no es endémica.	Toxinas termolábil (LT) y termoestable (ST), EAST1, EatA, ClyA; fimbrias CFA I, CFA II, K88 y K99, adhesina glicosilada TibA y adhesina/invasina Tia [revisado en (Turner et al, 2006)].
EPEC <i>(E. coli</i> enteropatógena)	Diarrea aguda. Puede haber vómito y fiebre.	Niños menores de 6 meses.	BFP, Intimina, Tir, Esps, Nles, sistema de secreción tipo III (Sep y Esc).
EHEC <i>(E. coli</i> enterohemorrágica)	Diarrea acuosa con sangre, síndrome urémico hemolítico y colitis hemorrágica.	Adultos y niños, principalmente en EEUU, Argentina, Australia, Chile, Sudáfrica y Canadá.	Intimina, Tir, Esps, Nles, sistema de secreción tipo III (Sep y Esc), toxina tipo Shiga (Stx), enterohemolisina.
EAggEC <i>(E. coli</i> enteroagregativa)	Diarrea acuosa persistente, con moco, poca fiebre y poco o nulo vómito.	Niños.	Fimbrias AAF/I y AAF/II, proteína involucrada en colonización Pic, toxina Pet, enterotoxina ShET-1, hemolisina E, dispersina Aap y toxina termoestable EAST-1 (“enteroagregative heat-stable toxin-1”) [revisado en (Navarro-García & Elias, 2011)].
EIEC <i>(E. coli</i> enteroinvasiva)	Diarrea acuosa, algunas veces cuadro disentérico con sangre, moco y pus, junto con fiebre.	Adultos.	Ipas (“invasion plasmid antigens”), secreción tipo III (Mxi y Spa) y VirG/IcsA.
DAEC <i>(E. coli</i> difusoadherente)	Diarrea acuosa persistente.	Niños de 2 a 5 años.	Fimbria F1845 y adhesina no fimbrial de membrana externa AIDA-1.
<b>EXTRAIESTINALES</b>			
UPEC <i>(E. coli</i> uropatógena)	Infección del tracto urinario (uretritis, cistitis y pielonefritis).	Principalmente mujeres.	Fimbria tipo I, fimbria P, adhesinas no fimbriales (Afa-I y Afa-III), hemolisina y toxina CNF-1 (“cytotoxic necrotizing factor 1”).
NMEC <i>(E. coli</i> asociada a sepsis y meningitis)	Sepsis y meningitis neonatal.	Recién nacidos.	Cápsula, fimbria tipo I, fimbria S, proteínas de invasión IbeA e IbeB.

\*Modificado de Puente y Finlay (2001).

---

---

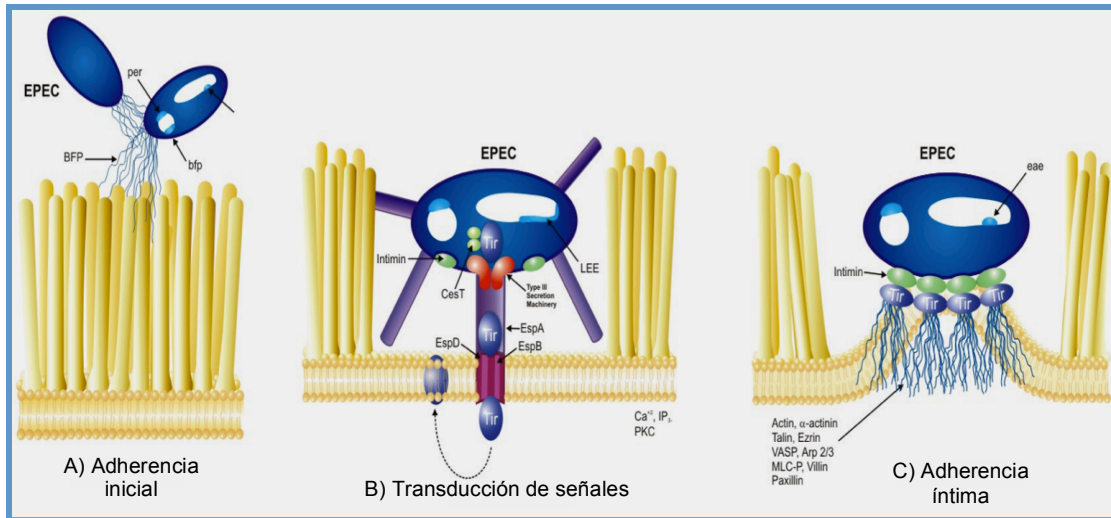
## 1.2 *Escherichia coli* Enteropatógena y Enterohemorrágica

EPEC y EHEC son patógenos intestinales que colonizan el intestino delgado y el colon, respectivamente (Torres et al, 2005). EPEC es el agente etiológico bacteriano predominante de la diarrea infantil en países en vías de desarrollo, afectando principalmente a niños menores de 6 meses (Nataro & Kaper, 1998). EHEC, por su parte, es un patógeno emergente, principalmente en los países desarrollados; puede provocar diarrea sin sangre, así como colitis hemorrágica (Riley et al, 1983) y síndrome urémico hemolítico (HUS, por sus siglas en inglés), el cual puede provocar daño renal agudo e incluso la muerte (Karmali et al, 1983). Ambos patógenos colonizan la superficie del epitelio intestinal, donde se unen a la superficie de las células hospederas e inyectan directamente factores de virulencia mediante un sistema especializado de secreción denominado sistema de secreción tipo III (SST3), el cual está presente en varias bacterias Gram-negativas, principalmente patógenas de animales o plantas [revisado en (Beeckman & Vanrompay, 2010)].

El SST3 es una maquinaria molecular multimérica especializada, compuesta de aproximadamente 20 proteínas que forman una jeringa molecular, a través de la cual se inyectan diversas proteínas efectoras hacia el citoplasma de la célula hospedera. La liberación de estas proteínas efectoras dentro de las células epiteliales reconduce a una histopatología característica conocida como lesión de “Adherencia y Eliminación” (A/E) (Fig. 1), que se caracteriza por la adherencia íntima de la bacteria a la superficie del epitelio intestinal, la eliminación de las microvellosidades del enterocito y la formación de un pedestal de actina polimerizada (Vallance & Finlay, 2000). Una de las proteínas que se secretan es la proteína efectora Tir, la cual una vez translocada se inserta en la membrana de la célula epitelial y funciona como receptor para la proteína de membrana externa de la bacteria llamada intimina, que actúa como adhesina (Kenny et al, 1997).

Tanto EPEC como EHEC pertenecen a un grupo de bacterias denominado “patógenos A/E”, dentro del cual se encuentran patógenos de animales como EPEC de conejo (REPEC) (Adams et al, 1997), de puerco (PEPEC) (An et al, 2000) y *C. rodentium* (Luperchio et al, 2000).

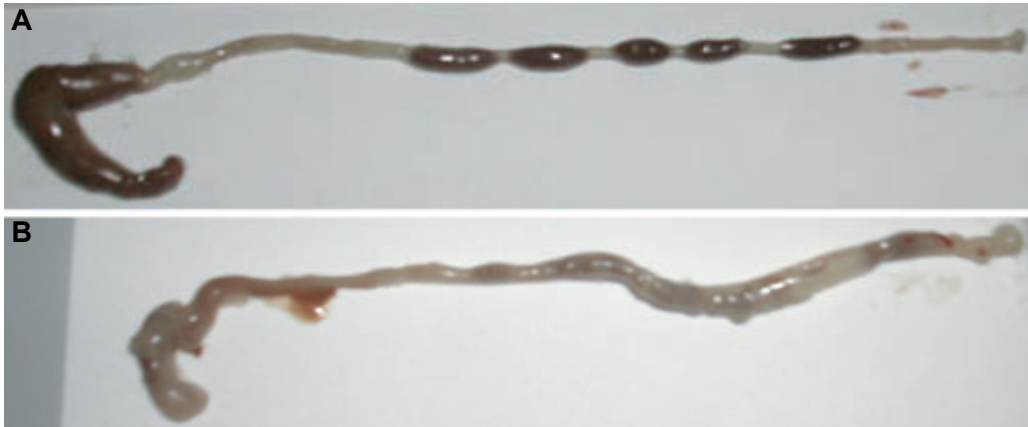




**Fig.1.** Modelo de patogénesis de EPEC. **A)** La adherencia localizada está mediada por la producción del pilus BFP. Los genes necesarios para la producción de este pilus están codificados en el plásmido EAF (Sohel et al, 1996; Stone et al, 1996). **B)** La transducción de señales ocurre cuando EPEC le inyecta factores de virulencia a la célula hospedera mediante el sistema de secreción tipo III, las cuales activan vías de señalización celulares causando alteraciones en la arquitectura del citoesqueleto, lo que resulta en la despolimerización de actina y la pérdida de las microvellosidades. **C)** La adherencia íntima se da cuando Tir es translocada a la célula hospedera donde es fosforilada. Posteriormente, Tir se inserta en la membrana de la célula hospedera y funciona como receptor para la proteína de membrana externa intimina. La fosforilación de Tir también lleva al reclutamiento de proteínas de la célula hospedera para la formación del pedestal de actina. Modificado de Strynadka y Ness (2002).

### 1.3 *Citrobacter rodentium*

*Citrobacter rodentium* (inicialmente conocida como *Citrobacter freundii* biotipo 4280) es un patógeno murino Gram-negativo que se identificó por primera vez en medicina veterinaria como el agente microbiano responsable de la hiperplasia colónica transmisible en ratones (Eckmann, 2006; Luperchio & Schauer, 2001). Los primeros reportes de infecciones por *C. rodentium* mencionaban distintos rangos de mortalidad, así como una variedad de manifestaciones clínicas (que incluían heces blandas, diarrea y prolapso rectal), pero con una similitud importante: el engrosamiento (o hiperplasia) del colon (Fig. 2) (Mundy et al, 2005).



**Fig. 2.** Efectos de la infección por *C. rodentium*. Cecum y colon tomados de **(A)** un ratón no infectado y **(B)** un ratón infectado por vía oral con *C. rodentium* silvestre. La infección resulta en cecum vacío y retraído y un cólon engrosado y sin heces normales. Tomado de Mundy *et al.*, 2005.

La infección de ratones por vía oral con esta bacteria, crecida en cultivos puros o proveniente de suspensiones de colonos infectados, resulta en la inducción de síntomas clínicos y en la recuperación de la bacteria de los animales infectados (Barthold *et al.*, 1976; Brennan *et al.*, 1965; Ediger *et al.*, 1974). Además, si se pone a un ratón infectado a convivir con ratones no infectados, la enfermedad se esparce en 6 días (Brennan *et al.*, 1965). Esta enfermedad infecciosa, que cumple con los postulados de Koch, se denominó hiperplasia colónica transmisible murina (TMCH) (Barthold *et al.*, 1978). Pocas horas después de la inoculación oral ocurre la colonización en la superficie del tejido linfoide del ciego y, tres días después, las bacterias pueden encontrarse también en el colon distal. Entre los días 21-28 postinoculación (pi) *C. rodentium* deja de ser detectable. La lesión principal, visible entre los días 5 y 14 pi, es el engrosamiento del intestino que comienza por el colon distal y se extiende en algunos casos al resto del colon. Estas lesiones se acompañan de heces suaves. En los animales que se recuperan, las lesiones desaparecen completamente a las 7 semanas pi y desarrollan inmunidad [revisado en (Luperchio & Schauer, 2001)].

Además de la formación de la lesión A/E, *C. rodentium* comparte otras similitudes estructurales y funcionales con EPEC, por ejemplo, las infecciones producidas por estas bacterias en sus respectivos hospederos provocan respuestas inmunes similares. Esto sugiere que *C. rodentium* es funcionalmente similar a EPEC, lo que hace de la infección

---

---

murina provocada por *C. rodentium* un buen modelo para las infecciones con EPEC (Eckmann, 2006).

#### 1.4 Adherencia

La adherencia es un evento importante en la colonización de la superficie de los tejidos del hospedero y la promoción de ésta por fimbrias es, por lo regular, un paso esencial en la infección (Smyth et al, 1996). Entre las estructuras de superficie más comúnmente involucradas en las primeras interacciones de las bacterias con la superficie de las células del hospedero están las fimbrias o *pili* (singular *pilus*), las cuales generalmente se unen a receptores específicos en el hospedero (Nougayrède et al, 2003). EPEC, por ejemplo, utiliza una fimbria tipo IV llamada BFP (“bundle forming pilus”) (Giron et al, 1991) para adherirse a las células epiteliales de manera no íntima en un patrón denominado de adherencia localizada (LA) (Vallance & Finlay, 2000). Se ha sugerido que esta adherencia está mediada por la interacción específica entre BFP y el fosfolípido fosfatidiletanolamina (Khursigara et al, 2001). Esta fimbria está codificada en el operón *bfp*, el cual está formado por 14 genes y se localiza en un plásmido de 70 mDa denominado EAF (Stone et al, 1996).

Por otro lado, a partir de la secuenciación de los cromosomas de dos cepas, se determinó que EHEC posee al menos 16 probables operones fimbriales (Hayashi et al, 2001; Perna et al, 2001). A la fecha se han descrito varias fimbrias que contribuyen a la adherencia de esta bacteria, entre las cuales se encuentran ECP (“*E. coli* common pilus”) (Rendon et al, 2007), la fimbria ELF (“*E. coli* YcbQ laminin-binding fimbriae”) (Samadder et al, 2009), dos fimbrias polares largas (LPF, “[l]ong [p]olar [f]imbriae”) (Torres et al, 2002; Torres et al, 2004), la fimbria F9 (Low et al, 2006), curli (Kim & Kim, 2004) y una fimbria tipo IV llamada HCP (“hemorrhagic coli pilus”) (Xicohtencatl-Cortes et al, 2007) (Tabla 2); así como adhesinas no fimbriales, como las proteínas de membrana externa intimina (Donnenberg et al, 1993) y OmpA (Torres et al, 2006), el factor de adherencia de EHEC (EfaI) (Nicholls et al, 2000) y el homólogo de la adhesina IgrA (Iha) (Tarr et al, 2000).

**Tabla 2.** Adhesinas fimbriales de EHEC.

FIMBRIA	OPERÓN	SIMILITUD	SUBUNIDAD PRINCIPAL	FUNCIÓN DE LOS GENES
ECP	<i>ecpRABCDE</i>	No tiene similitud a otras fimbrias	EcpA de 20 kDa	<i>ecpA</i> - subunidad principal <i>ecpB</i> - probable chaperona <i>ecpC</i> - probable usher <i>ecpD</i> - probable chaperona <i>ecpE</i> - subunidad menor
ELF	<i>ycbQRST</i>	Fimbrias F17 de ETEC	YcbQ (ElfA) de 18 kDa	<i>ycbQ (elfA)</i> - subunidad principal <i>ycbR</i> - chaperona <i>ycbS</i> - usher <i>ycbT</i> - subunidad menor
LPF1	<i>lpfABCC'DE</i>	Fimbrias LPF de Salmonella entérica serovar Typhimurium	LpfA de 18.5 kDa	<i>lpfA</i> - subunidad principal <i>lpfB</i> - chaperona <i>lpfC</i> - chaperona usher <i>lpfC'</i> - usher <i>lpfD</i> - subunidad menor <i>lpfE</i> - subunidad
LPF2	<i>lpfA2B2C2D2D'2</i>	Fimbrias LPF de Salmonella entérica serovar Typhimurium	LpfA2 de 20.8 kDa	<i>lpfA2</i> - subunidad principal <i>lpfB2</i> - chaperona <i>lpfC2</i> - usher <i>lpfD2</i> - subunidad menor <i>lpfD'2</i> - subunidad menor
F9	Z2200-Z2206	Fimbrias tipo 1	Z2200 de 17 kDa	Z2200- subunidad principal Z2201- chaperona Z2203- usher Z2204- subunidad menor Z2205- subunidad menor Z2206- adhesina
CURLI	<i>csgBAC</i> y <i>csgDEFG</i>		CsgA de 13.9 kDa	<i>csgA</i> - subunidad principal <i>csgB</i> - subunidad menor <i>csgC</i> - proteína involucrada en producción <i>csgD</i> - probable regulador transcripcional de 2 componentes <i>csgE</i> - componente de transporte y ensamblaje <i>csgF</i> - componente de transporte y ensamblaje <i>csgG</i> - componente de transporte y ensamblaje
HCP	<i>hcpA</i> , <i>hofB</i> y <i>hofC</i>	Fimbrias tipo IV	HcpA de 19 kDa	<i>hcpA</i> - subunidad principal dependiente de prepilin-peptidasa <i>hofB (hcpB)</i> - proteína integral de membrana con similitud a PilB <i>hofC (hcpC)</i> - proteína integral de membrana con similitud a PilC

En el caso de *C. rodentium* la secuenciación de su genoma reveló que contiene un total de 19 operones fimbriales, incluyendo 4 operones incompletos. De éstos, 4 codifican

---

---

para fimbrias tipo IV (operones *hofCD-ppdD*, *tadZABCDE* y *tadVEFG*, *hofMNOPQ* y *cfcABCDEFGHJIPV*), uno para fimbria curli (operón *csgGFEDBAC*), uno para fimbria polar larga (operón *lpfEDCBA*) y el resto para fimbrias ensambladas por la vía chaperona-usher (Petty et al, 2010). Se ha determinado que de estos operones, sólo los productos de 2 están involucrados en colonización gastrointestinal: la fimbria Kfc (ensamblada por la vía chaperona-usher) y la fimbria tipo IV CFC (“colonization factor *Citrobacter*”), ésta última identificada como un factor de virulencia específico de *C. rodentium* (Hart et al, 2008; Mundy et al, 2005).

## 1.5 Fimbrias

El término “fimbria” lo introdujeron Duguid y colaboradores (1955) en un estudio donde demuestran que estas estructuras de superficie median la adherencia de *E. coli* a células eucariontes. Cuatro años más tarde se acuñó el término alternativo “pilus” para denotar filamentos bacterianos no-flagelares (Brinton, 1959). Ambos términos se utilizan actualmente de manera indistinta, aunque muchos investigadores prefieren reservar el término “pilus” para los apéndices sexuales involucrados en conjugación (Li & Mobley, 2001).

Las fimbrias o *pili* son apéndices adhesivos parecidos a cabellos que se proyectan de la superficie de la bacteria, con diámetros que van de 2 a 8 nm. Son más delgados y generalmente más cortos y más numerosos que los flagelos. Estas estructuras comprenden un filamento anclado a la membrana externa de la bacteria y un factor de adherencia bacteriano o adhesina localizada en la punta, la cual confiere la especificidad de unión y el reconocimiento del receptor. La estructura principal, también conocida como “varilla fimbrial” o “eje del pilus”, está compuesta de varios cientos (o probablemente miles) de pequeñas subunidades o pilinas de 15-25 kDa. Su función principal es la de adherir a la bacteria a una superficie y, por lo regular, no están involucradas en movilidad celular. Son factores de virulencia importantes para bacterias causantes de varias enfermedades, en particular de las infecciones de los tractos urinario, genital y gastrointestinal (Proft & Baker, 2009).

---

---

## 1.6 Clasificación

Desde su primera descripción, las fimbrias se han identificado en un gran número de especies bacterianas. A lo largo de los años, su abundancia ha motivado numerosos esfuerzos para clasificarlas, en un principio, con base a su morfología y a sus características funcionales. Aunque esta clasificación no refleja la relación filogenética entre ellas, algunos fragmentos de esta nomenclatura han sobrevivido, como el término “fimbrias tipo I” para denotar filamentos rígidos que median la hemaglutinación sensible a manosa; y el término “fimbrias tipo IV” para denotar una clase de apéndices polares que median la motilidad especializada conocida como “twinching motility” (Nuccio & Baumler, 2007).

Los primeros estudios de estas estructuras fueron descriptivos y se basaron en sus diferencias en morfología, serología o capacidad de hemaglutinación, lo que creó una situación caótica con varios sistemas de clasificación. Por ejemplo, Brinton (1959) describió 6 tipos de fimbrias basados en la morfología, los cuales designó como tipo I-V y F. Por su parte, Duguid y colaboradores (1955) propusieron 7 categorías (tipo 1-6 y F) basadas en el grosor y la actividad de hemaglutinación (resistentes o sensibles a manosa). Esto llevó a un sistema de nomenclatura muy diverso, por ejemplo, las fimbrias K88 y K99 de *E. coli* se denominaron K porque se identificaron inicialmente como antígenos capsulares; las fimbrias CFA de ETEC se nombraron así por su función (“colonization factor antigens”); las fimbrias P de UPEC se nombraron así por su contribución a una enfermedad (“pyelonephritis-associated pili”), mientras que las fimbrias S se nombraron así por su receptor (sialil galactósido); las fimbrias TCP de *Vibrio cholerae* recibieron este nombre por su patrón de expresión (“toxin-coregulated pili”) y las fimbrias BFP de EPEC por su apariencia característica (“bundle-forming pili”) (Li & Mobley, 2001).

Otra clasificación se basa en la secuencia primaria de las subunidades principales, llevando a la identificación de 6 clases:

- **Clase 1-** formada por las fimbrias tipo I y P, cuyas subunidades principales poseen 2 residuos de cisteína separados por 38 a 43 aa y que forman un puente disulfuro. También tienen conservado un residuo de fenilalanina localizado a 8 aa de la

---

---

cisteína N-terminal y la penúltima tirosina en el C-terminal.

- **Clase 2-** incluye a la fimbria F1845, así como a las adhesinas no fimbriales AFA-I, AFA-III y Dr de DAEC. Estas adhesinas contienen 2 cisteínas conservadas separadas por 31 aa, una fenilalanina conservada localizada a 16 aa de la cisteína N-terminal y una tirosina localizada a 4 aa del C-terminal, excepto por AFA-I que contiene una fenilalanina en esta posición.
- **Clase 3-** incluye a las fimbrias K88, CS31 y F41 de ETEC. Difiere de las clases anteriores en que las fimbrias de esta clase carecen de residuos de cisteína, aunque poseen la penúltima tirosina en el C-terminal como la clase 1. Estas 3 fimbrias también comparten 15 aa en su secuencia líder así como 4 residuos de prolina en la proteína madura.
- **Clase 4-** está formada únicamente por BfpA de EPEC. Esta proteína comparte similitud de secuencia con fimbrias tipo IV de *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella* y *Vibrio* spp, especialmente en el N-terminal.
- **Clase 5-** incluye a las fimbrias CS1 y CFA/I de ETEC, las cuales carecen de cisteínas y de residuos de tirosina en el C-terminal.
- **Clase 6-** incluye a las fimbrias curli de *E. coli* y SEF17 de *Salmonella*, ambas miembros de la familia GVVPQ. Esta familia comprende fimbrias agregativas delgadas que requieren de depolimerización con ácido fórmico previo al análisis por SDS-PAGE. Las subunidades principales miden entre 17 y 18 kDa y poseen la secuencia GVVPQ en el N-terminal, la cual está altamente conservada (Collinson et al, 1992).

## 1.7 Tipos de fimbrias

Existen varios tipos de fimbrias, de las cuales las más estudiadas son las fimbrias tipo I, que son importantes para la propagación de *E. coli* de un hospedero a otro (Bloch et al, 1992), aumentan la colonización en el intestino e intervienen en la formación de

---

---

biopelículas (Holden & Gally, 2004); las fimbrias P de UPEC, que están asociadas al proceso de colonización en las infecciones de vías urinarias (Vaisanen-Rhen et al, 1984); y los *pili* tipo IV presentes en varios patógenos, que median la adherencia a células hospederas, formación de microcolonias y absorción de bacteriófagos, así como motilidad bacteriana por “twitching motility”, la cual es una forma de movimiento especializada basada en la proyección y retracción del *pilus* que le permite a la bacteria desplazarse sobre superficies semisólidas (Craig et al, 2003).

\* **Fimbrias Tipo I:** su estructura la determinó Brinton (1967) mediante microscopía electrónica, cristalografía y difracción de rayos X. Están codificadas por el operón *fim* (*fimA-fimH*, Fig. 8 panel inferior), tienen una estructura compuesta basada en una varilla fimbrial helicoidal gruesa (6.9 nm) y larga (1-2  $\mu$ m) formada por 500 a 3000 copias de la subunidad principal FimA. La varilla fimbrial está conectada mediante FimF a la punta fimbrial de 3 nm de ancho formada por FimG y FimH (Hahn et al, 2002; Jones et al, 1995). FimH es la adhesina que se une a receptores que contienen manosa y que se expresan en muchos tipos de células hospederas (Baorto et al, 1997; Zhou et al, 2001). Estas fimbrias se encuentran en muchas cepas de *E. coli* y están distribuidas en toda la familia *Enterobacteriaceae*. Son el tipo de fimbria más prevalente en UPEC donde contribuyen significativamente a las infecciones de vejiga (cistitis) (Connell et al, 1996).

\* **Fimbrias P:** son factores de virulencia críticos en el establecimiento de pielonefritis por UPEC mediante el reconocimiento y adherencia a tejidos del riñón (Mulvey et al, 2000). Son similares a las Tipo I y están codificadas por 11 genes *pap* (Fig. 8 panel superior). La varilla fimbrial mide 6.8 nm de ancho y varias micras de largo y está compuesta de 3.28 subunidades de PapA por vuelta. La punta fimbrial está formada por PapG y tres subunidades menores llamadas PapE, PapF y PapK (Bullitt & Makowski, 1995; Kuehn et al, 1992).

\* **Fimbrias S:** tienen una arquitectura similar a la de las fimbrias tipo I y P, aunque no está tan bien definida. Están asociadas con cepas de *E. coli* que provocan sepsis, meningitis y enfermedades del tracto urinario (UTI, por sus siglas en inglés). Las fibras están compuestas de una subunidad principal llamada SfaA y 3 subunidades menores llamadas SfaG, SfaH y SfaS. La adhesina SfaS interactúa con residuos de ácido siálico en células endoteliales y con receptores de células epiteliales de riñón (Mulvey, 2002).



---

---

\* **Fimbrias Tipo IV:** son fibras delgadas (6-8 nm de ancho), flexibles, de varias micras de largo, que por lo regular se asocian lateralmente formando agregados característicos (Pellicic, 2008). Además de la adherencia a células hospederas y la formación de biopelículas, que son características que comparten con otras fimbrias, los pili tipo IV poseen características únicas, incluyendo la capacidad de absorción de DNA durante la transformación, la transducción de fagos y la “twitching motility” (Craig & Li, 2008). Estas fimbrias están compuestas de subunidades que comparten características distintivas, como una secuencia líder corta cargada positivamente, un amino ácido inusual modificado en el primer residuo de la proteína madura (N-metil-fenilalanina) y un dominio N-terminal altamente conservado e hidrofóbico (Smyth et al, 1996). Son homopolímeros formados por una sola subunidad de 15-20 kDa, algunos poseen una adhesina en la punta. Una característica de las pilinas tipo IV es que se sintetizan como prepilinas con un péptido líder hidrofílico que termina con una glicina, la cual es cortada por una peptidasa líder única (Pellicic, 2008). Los pili tipo IV pueden clasificarse en dos grupos, basados en el largo de la proteína madura y en el largo del péptido líder en la prepilina. Las pilinas tipo IVa poseen péptidos líder cortos de menos de 10 residuos y un largo de 150 a 160 residuos, mientras que las pilinas tipo IVb tienen péptidos líder largos de 15 a 30 residuos y pueden ser largas (180 a 200 residuos) o muy cortas (40 a 50) (Proft & Baker, 2009).

\* **Curli:** son fibras tipo amiloides, agregativas y enrolladas que miden entre 6 y 12 nm de diámetro y son de longitud variable, aparecen como una matriz amorfa y enredada que se extiende entre 0.5 y 1  $\mu\text{m}$  de la superficie celular (Chapman et al, 2002). Estas adhesinas inicialmente se identificaron por su habilidad de mediar la unión a fibronectina (Olsen et al, 1989) y rojo Congo (Hammar et al, 1995) y ahora se sabe que participan en la unión a superficies abióticas (Pawar et al, 2005). Se identificaron por primera vez en *E. coli* (Olsen et al, 1989) pero también las produce *Salmonella* (Collinson et al, 1991), donde están involucradas en la formación de biopelículas. En *S. enterica* serovares Typhimurium y Enteritidis, la expresión de curli y de celulosa se asocia con el morfotipo rdar, el cual refleja el comportamiento multicelular. El término rdar se da a colonias de morfología rugosa y seca que son capaces de teñirse con rojo Congo (Romling, 2005).

---

---

## 1.8 Mecanismos de biogénesis

Otra forma de clasificación se basa en el mecanismo de ensamblaje. Las 4 clases de ensamblaje son:

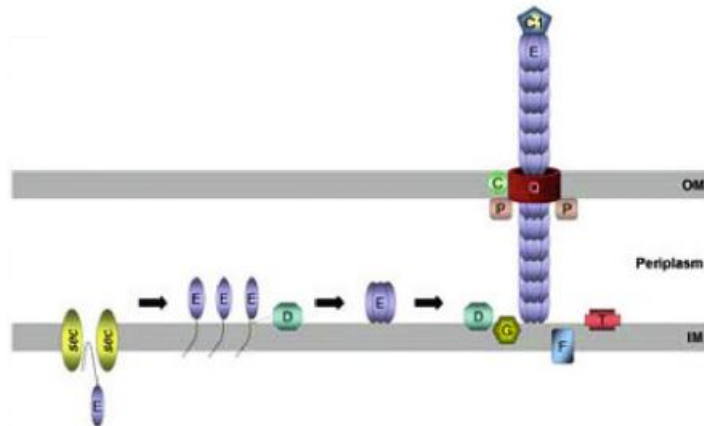
**1.- Vía de secreción general.** Es mediante la cual se sintetizan las fimbrias tipo IV. La biogénesis de la fimbrias tipo IV es más complicada que la de las fimbrias ensambladas por las vías chaperona-usher o la vía chaperona-usher alterna. Muchos de los genes que codifican para los *pili* tipo IVa se localizan de manera dispersa en el cromosoma, mientras que los que codifican para los *pili* tipo IVb son menos numerosos y están siempre agrupados (Pelicic, 2008). El número de genes esenciales para la biogénesis y función de los *pili* tipo IV varía entre 14, para *pili* como BFP, a más de 20, para estructuras como el *pilus* tipo IVa de *Neisseria gonorrhoeae* (Stone et al, 1996). La biogénesis ocurre en 3 pasos: formación de las fibras, estabilización de la fibra y localización en la superficie del organelo intacto (Fig. 3). Primero, la maquinaria Sec transporta a las prepilinas hacia el periplasma. Después de la translocación, las subunidades de prepilinas permanecen ancladas en la membrana interna mediante los dominios  $\alpha$ -helicoidales del N-terminal hidrofóbico, con las cabezas C-terminal hidrofílicas orientadas hacia el periplasma. La remoción de la secuencia líder cargada positivamente de la prepilina por la señal peptidasa lleva a los tallos hidrofóbicos de las pilinas a asociarse para formar el *pilus*. Un complejo de ensamblaje formado por varias proteínas ayuda en el proceso. La proteína asociada a membrana externa estabiliza a la fibra naciente antes de la translocación y previene la retracción. El *pilus* ensamblado penetra la membrana externa a través de un canal oligomérico cerrado electroquímicamente. La adhesina localizada en la punta facilita el paso del *pilus* naciente a través del poro (Schaechter, 2009).

**2.- Vía de nucleación-precipitación extracelular.** Las fimbrias curli se sintetizan por medio de la vía de nucleación-precipitación extracelular. Esta vía involucra dos operones que se expresan divergentemente. El operón *csgBA* codifica para las subunidades CsgA y CsgB, mientras que el operón *csgDEFG* codifica para proteínas esenciales en la regulación y el transporte de CsgA y CsgB a la superficie celular. La subunidad principal CsgA se secreta a la superficie celular como una proteína soluble no estructurada, una vez ahí, interactúa con la proteína CsgB unida a membrana, la cual nuclea la fibrilación de CsgA. Después de este paso inicial, se cree que las fibras amiloides crecen por adición de

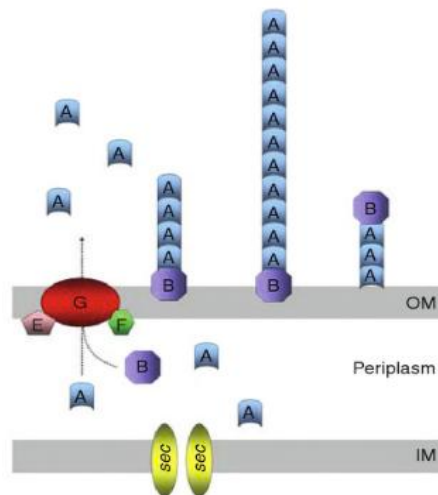
---

---

CsgA a la estructura naciente (Fig. 4) (Dueholm et al, 2011).

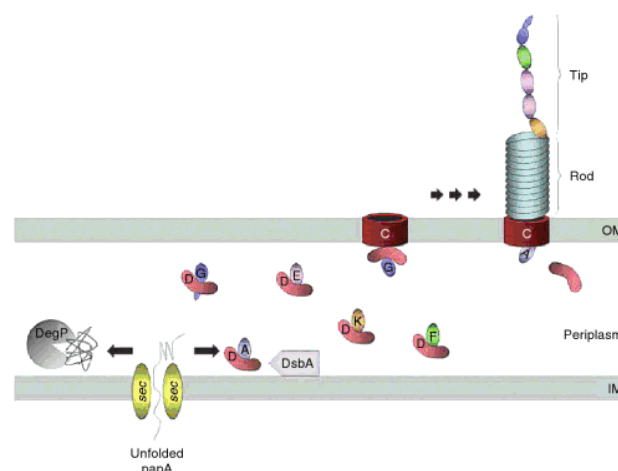


**Fig. 3.** Modelo de ensamblaje del pilus tipo IV de *N. gonorrhoeae*. La prepilina PilE es translocada hacia periplasma ayudada por la maquinaria Sec. PilE es procesada por la señal peptidasa PilD, la cual corta la secuencia líder cargada positivamente del N-terminal de la pilina. Un complejo de ensamblaje de membrana interna ensambla a la subunidad madura PilE en una fibra. PilQ media la translocación del pilus a través de la membrana externa, posiblemente con ayuda de otros factores como PilP. PilC se asocia con el pilus y puede actuar como un clip restrictivo, previniendo la retracción del pilus mediada por PilT. La adhesina PilC1, la cual parece estar incorporada en la punta de la fibra creciente, también parece ser requerida para translocación del pilus a través de la membrana externa. Tomado de (Schaechter, 2009).



**Fig. 4.** Modelo del ensamblaje de curli por la vía de nucleación-precipitación extracelular. CsgA, el principal componente de curli de *E. coli*, es secretada a través de la membrana externa. CsgB sirve para nuclear el ensamblaje de CsgA. CsgG es una lipoproteína localizada en la membrana externa que es requerida para la secreción de CsgA y CsgB, aunque su función todavía no es clara. CsgE y CsgF son proteínas periplásmicas que interactúan con CsgG en la membrana externa. Tomado de (Schaechter, 2009).

**3.- Vía chaperona-usher.** Es la vía más común y mediante la cual se sintetizan las fimbrias tipo I y P. En esta vía, el sistema general de secreción (Sec) transloca inicialmente a las subunidades a través de la membrana citoplásmica. Una vez en periplasma, las subunidades se retienen transitoriamente en la membrana interna mediante la interacción de ésta con el C-terminal de la subunidad. Posteriormente, se unen a una chaperona periplásmica que las desprende de la membrana interna y quedan en espacio periplásmico formando un complejo chaperona-subunidad (Hultgren et al, 1989). La unión de la chaperona con la subunidad evita que las subunidades interactúen entre sí antes de tiempo, las protege de degradación por proteasas periplásmicas (Bann & Frieden, 2004) y las dirige hacia la plataforma de ensamblaje de membrana externa formada por la proteína “usher” o acomodadora, la cual a su vez facilita la translocación de las subunidades hacia la superficie bacteriana (Thanassi et al, 1998a). En ausencia de la chaperona, las subunidades no pueden plegarse correctamente y forman agregados que la proteasa DegP degrada (Jones et al, 1997). La estructura dimérica formada por la proteína acomodadora posee un poro que, aparentemente, permanece cerrado hasta que la unión del complejo chaperona-subunidad provoca un cambio conformacional que abre un canal de 2 a 3 nm de diámetro a través del cual se transloca la subunidad (Thanassi et al, 1998b). Después del contacto con el complejo chaperona-subunidad, la proteína acomodadora disocia a la subunidad de la chaperona, la transporta a través del canal y la ancla a la estructura fimbrial naciente que se va ensamblando en la membrana externa (Remaut et al, 2008) (Fig. 5).



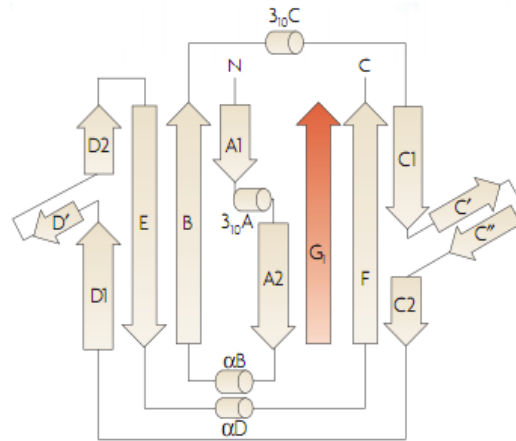
**Fig. 5.** Modelo de ensamblaje del pilus P por la vía chaperona-usher. Las subunidades estructurales de la punta fimbrial (PapG, PapF, PapE y PapK), así como del cuerpo de la fimbria (PapA) son translocadas a través de la membrana interna mediante el sistema Sec. En el lado periplásmico de la membrana interna interactúan con la chaperona PapD, la cual facilita el

---

---

plegamiento y la liberación de las subunidades de la membrana interna. DsbA es requerida para el correcto plegamiento de las subunidades y de la chaperona. En ausencia de PapD, las subunidades se agregan y son degradadas por la proteasa periplásmica DegP. Los complejos chaperona-subunidad son dirigidos hacia el complejo usher de membrana externa donde la chaperona es liberada y ocurren las interacciones subunidad-subunidad. La proteína acomodadora forma un poro de 2 nm de diámetro a través del cual se ensambla la estructura del pilus y extruye como una fibra lineal a través de la membrana externa. Tomado de (Schaechter, 2009).

Las chaperonas que participan en esta vía son proteínas en forma de “boomerang”, de aproximadamente 25 kDa que consisten de dos dominios tipo inmunoglobulina (Ig) estabilizados por un puente salino conservado (Holmgren & Branden, 1989; Kuehn et al, 1993). Las superficies interactivas que contactan a la subunidad están formadas por dos residuos básicos conservados localizados entre los dos dominios tipo Ig y por las cadenas beta N-terminal y séptima (A1 y G1, respectivamente) del dominio N-terminal de la chaperona (Slonim et al, 1992). Por su parte, las subunidades se caracterizan por un dominio tipo Ig incompleto que carece de la cadena beta C-terminal (Choudhury et al, 1999; Sauer et al, 1999), y una extensión N-terminal (Nte) de 10-20 residuos de largo que no forma parte del plegamiento (Sauer et al, 1999). La ausencia de la cadena beta C-terminal hace que todas las subunidades posean un surco donde la cadena faltante normalmente completaría el domino Ig. En los complejos chaperona-subunidad, un motivo de 4 residuos hidrofóbicos alternantes en la cadena G1 de la chaperona se insertan en este surco hidrofóbico. Estos 4 residuos se designan P1 a P4, y sus sitios aceptores correspondientes en el surco de la subunidad se conocen como sitios P1 a P4 (Waksman & Hultgren, 2009). Las chaperonas periplásmicas de las fimbrias P y tipo I acoplan el plegamiento de la subunidad con la protección de los sitios de ensamblaje de la subunidad interactiva en un proceso denominado: complementación de la cadena donante (Fig. 6) (Hung et al, 1999; Sauer et al, 1999). En este proceso, la cadena beta G1 que recubre la hendidura del interdominio de la chaperona funciona transitoriamente como la cadena beta C-terminal de la subunidad, proporcionando la información estérica necesaria para el plegamiento completando el dominio tipo Ig de la subunidad (Kline et al, 2010).

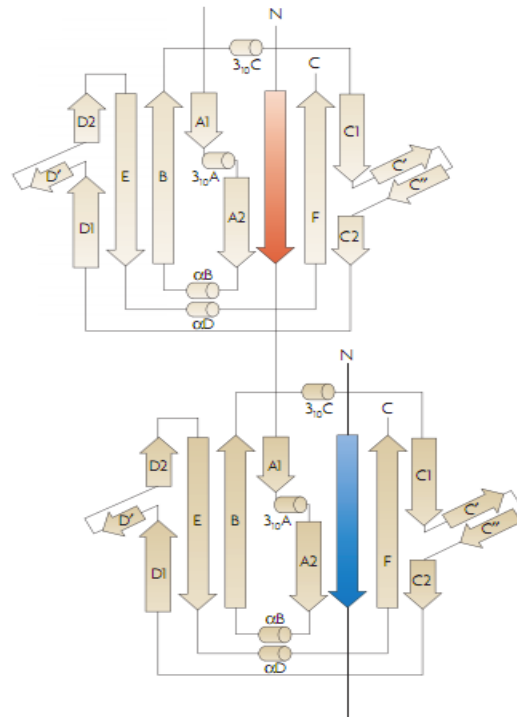


**Fig. 6.** Complementación de la cadena donante. Diagrama topológico de PapK. Las flechas y los cilindros representan cadenas-beta y alfa-hélices, respectivamente. Los extremos N y C-terminal están indicados. En el complejo chaperona-subunidad el Nte está desordenado y por lo tanto no se representa en el diagrama topológico. La flecha roja representa la cadena beta G1 donada por la chaperona. Tomado de (Waksman & Hultgren, 2009).

Durante la polimerización de las subunidades, el Nte de la subunidad siguiente reemplaza a la cadena beta G1 complementaria donada por la chaperona. Esta reacción de ensamblaje se denomina intercambio de cadena donante (Fig. 7) (Remaut et al, 2006; Sauer et al, 2002). Las secuencias Nte están relativamente conservadas, ya que contienen un grupo de residuos hidrofóbicos alternantes que forman una parte esencial de la interacción subunidad-subunidad (Waksman & Hultgren, 2009).

Las proteínas de membrana externa acomodadoras son proteínas de aproximadamente 800 aa que comprenden 4 dominios funcionales: un dominio N-terminal periplásmico de aproximadamente 125 aa, un dominio C-terminal periplásmico de aproximadamente 170 aa y un dominio de poro de translocación, central, largo de aproximadamente 500 aa que es interrumpido por un dominio de conexión conservado de aproximadamente 110 aa (Capitani et al, 2006; Nishiyama et al, 2003; Thanassi et al, 2002). El dominio periplásmico N-terminal une a los complejos chaperona-subunidad con alta afinidad (Ng et al, 2004; Nishiyama et al, 2005). Se ha visto que la mayor parte de la interacción se da entre la proteína acomodadora y la chaperona, sin embargo, una pequeña parte de la interfase comprende interacciones específicas con la subunidad (Nishiyama et al, 2003; Saulino et al, 1998). La función exacta del dominio C-terminal no

es clara. Trabajos con PapC han demostrado que este dominio es necesario para la unión correcta de los complejos-chaperona subunidad a la proteína acomodadora y tiene un papel importante en el ensamblaje de la fimbria completa (Huang et al, 2009; So & Thanassi, 2006).

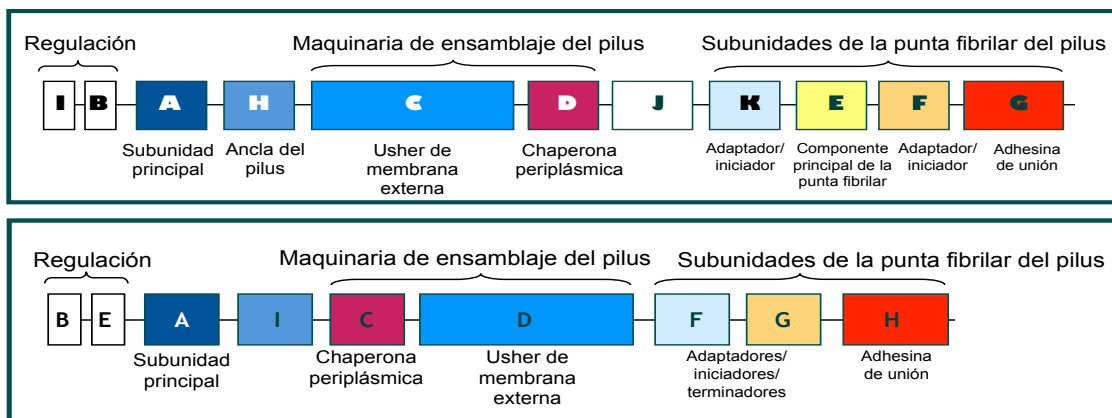


**Fig. 7.** Intercambio de cadena donante. Diagrama topológico de las subunidades en la fimbria. La representación es como en la Fig. 6. El Nte (rojo) de la siguiente subunidad complementa *in trans* el plegamiento de la subunidad previa. Tomado de (Waksman & Hultgren, 2009).

Los genes que codifican para fimbrias ensambladas por la vía chaperona-usher usualmente están agrupados en operones, los cuales codifican para al menos 3 proteínas distintas: la subunidad principal, la chaperona periplásmica y la acomodadora. Además de estas proteínas, los operones fimbriales pueden codificar también para proteínas estructurales adicionales (ej. subunidades fimbriales menores), proteínas de ensamblaje (ej. chaperonas) o proteínas reguladoras (Nuccio & Baumler, 2007). Todos los operones fimbriales examinados hasta ahora codifican al menos para una proteína reguladora que activa o reprime la expresión de los genes fimbriales. La mayoría de los operones fimbriales presentes en *E. coli* y en *Salmonella* comparten una organización genética

similar: al principio se encuentran los genes involucrados en la regulación positiva o negativa, seguidos de la subunidad estructural principal. Los genes que codifican para la chaperona, la proteína acomodadora, proteínas adaptadoras y la adhesina fimbrial constituyen el resto del operón (Fig. 8) (Neidhardt & Curtiss, 1996).

Los operones fimbriales mejor estudiados son los de las fimbrias tipo I, P y S, que reconocen receptores que contienen  $\alpha$ -D-manosa, digalactósido y sialil, respectivamente. Generalmente, los genes que codifican para las subunidades estructurales se co-transcriben a partir de un solo promotor localizado corriente arriba del gen de la subunidad estructural principal, como en las fimbrias tipo I, o corriente arriba del regulador, como en las fimbrias P (Holden & Gally, 2004).

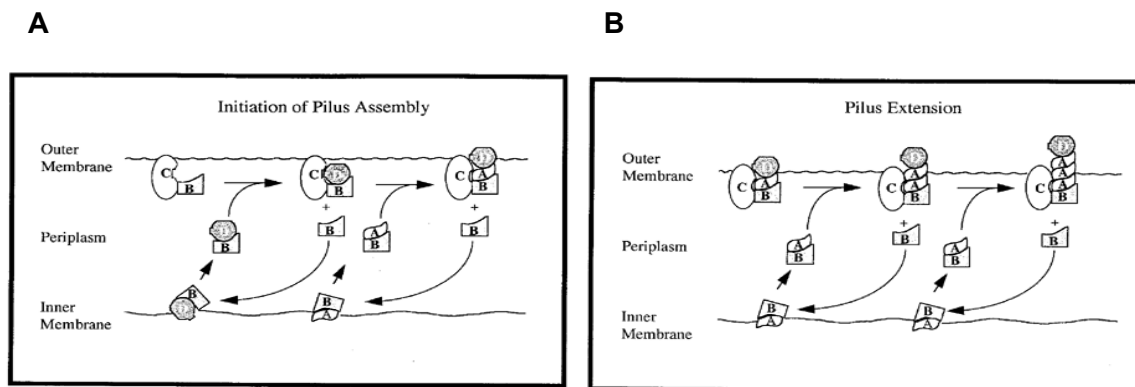


**Fig. 8.** Organización de los operones fimbriales *pap* (panel superior) y *fim* (panel inferior). Modificado de (Thanassi et al, 1998a).

**4.- Vía chaperona-usher alterna.** La clase chaperona-usher contiene un grupo designado la familia chaperona-usher alterna, cuyos miembros comparten homología de secuencia significativa entre ellos pero no con otros miembros de esta clase. La fimbria CS1 de ETEC es el miembro mejor caracterizado de este grupo. A diferencia de las fimbrias P, que requieren de 9 genes estructurales y de ensamblaje (Hultgren et al, 1991), y de las fimbrias tipo IV Tcp de *Vibrio cholerae* (Ogierman et al, 1993) y BFP de EPEC (Sohel et al, 1996; Stone et al, 1996) que requieren de hasta 14 genes, el operón que codifica para CS1 está formado por únicamente 4 genes (*cooBACD*) (Sakellaris & Scott,



1998). *CooA* es la subunidad principal de 16 kDa; posee una secuencia señal N-terminal que le permite translocarse al periplasma a través del sistema Sec. *CooC* es una proteína integral de membrana externa de 94 kDa que posee propiedades comunes de proteínas de membrana externa, incluyendo un alto contenido de hojas- $\beta$  y bajo contenido de  $\alpha$ -hélices, un alto contenido de residuos cargados y regiones hidrofóbicas no extensas; aunque no posee similitud de secuencia con proteínas de otras familias de fimbrias. *CooD* es una proteína de 38 kDa asociada a la punta del *pilus*. Tiene 13% de identidad con *CooA*, y se encuentra en proporción 1:1800 con ésta. Además de su papel como componente estructural de las fimbrias CS1, *CooD* también se requiere para el ensamblaje de la fimbria, ya que ésta no se forma en ausencia de *CooD*. Esto sugiere que *CooD* puede ser un iniciador limitante de la polimerización de *CooA*. Por último, *CooB* es una proteína de 28 kDa que tiene un papel esencial en el ensamblaje. Esta proteína se localiza principalmente en el periplasma, donde forma complejos intermoleculares con *CooA* y *CooD*, evitando la proteólisis de éstas (Fig. 9). Aunque parece funcionar como una chaperona, no contiene los residuos altamente conservados e invariables que definen a la secuencia consenso de chaperonas de pilinas periplásmicas, ni tiene homología de secuencia significativa con chaperonas descritas (Sakellaris & Scott, 1998).



**Fig. 9.** Modelo de ensamblaje de la fimbria CS1. **A)** Iniciación: todas las proteínas *Coo* son transportadas a través de la membrana interna vía el sistema Sec. Conforme entran al periplasma, la chaperona *CooB* se une a las subunidades *CooA* y *CooD*, para prevenir el plegamiento incorrecto y la degradación y para inhibir interacciones pilina-pilina inapropiadas o prematuras. *CooB* también se une a *CooC* para mantener su conformación y prevenir su degradación. Un complejo *CooB* y *CooD* inicia el ensamblaje del pilus uniéndose a *CooC*. *CooB* es simultáneamente desplazada y es reciclada hacia el periplasma donde puede interactuar con otras pilinas. Los complejos *CooB-CooA* desplazan a *CooD* de *CooC*, reemplazándola con *CooA*. **B)** La extensión del pilus ocurre por interacción repetida de los complejos *CooB-CooA* con *CooC*, lo que permite la incorporación de *CooA* en la base del pilus y la extensión de éste. Tomado de (Sakellaris & Scott, 1998).

---

---

La vía chaperona-usher es la clase de ensamblaje que contiene el mayor número de representantes. Debido a que los nombres de las fimbrias pertenecientes a esta clase, derivados de varios esquemas serológicos, funcionales y morfológicos, crean confusión, se ha buscado agruparlas por un método más claro y universal. La comparación de las secuencias de las proteínas acomodadoras ha servido para crear árboles filogenéticos. Este método tiene la ventaja de que los grupos filogenéticos resultantes no son ambiguos, ya que los operones fimbriales contienen una sola proteína acomodadora, mientras que pueden tener varias subunidades o chaperonas. Con esta clasificación se obtienen 6 clados:  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta),  $\gamma$  (gamma),  $\kappa$  (kapa),  $\pi$  (pi) y  $\sigma$  (sigma). Las fimbrias ensambladas por la vía chaperona-usher alterna, entre ellas las fimbrias ECP de EPEC, pertenecen al clado  $\alpha$ , (Nuccio & Baumler, 2007).

### 1.9 Regulación de operones fimbriales

Las fimbrias no se expresan de manera constitutiva, sino que se ensamblan sólo bajo condiciones ambientales específicas. Una forma de controlar la expresión de estos organelos es a nivel genético mediante la regulación positiva o negativa de la expresión de los genes fimbriales (Clegg et al, 2011). Uno de los operones fimbriales cuya regulación se ha estudiado más es la del operón *fim* de *E. coli*. La transcripción de *fimA* depende de la orientación de un elemento de DNA invertible (*fimS*) conocido como el “switch” *fim*, el cual contiene el promotor y está flanqueado por dos secuencias repetidas invertidas de 9 pb. La transcripción ocurre cuando el elemento está orientado a favor de *fimA*, mientras que en la orientación contraria no hay transcripción. La inversión de *fimS* la median dos recombinasas fimbriales sitio-específicas (FimB y FimE) que actúan independientemente y se unen a regiones cercanas a, y que sobrelapan con, las secuencias repetidas invertidas de 9 pb que flanquean al elemento *fimS* de 314 pb (Abraham et al, 1985; Klemm, 1986). FimE participa principalmente en la inversión del “switch” de la orientación “on” (a favor) a “off” (en contra), mientras que FimB media la inversión en ambas direcciones (Pallesen et al, 1989). Además de estas dos recombinasas, las proteínas reguladoras Lrp, IHF y H-NS también influyen en la inversión. Se propone que IHF y Lrp facilitan la inversión en la orientación “on”, mientras que H-NS mantiene la inversión en la orientación “off” (Blomfield et al, 1993; Eisenstein et al, 1987; Kawula & Orndorff, 1991).

---

---

Varios elementos del sistema fimbrial tipo I de *E. coli* también se encuentran en *Klebsiella pneumoniae*: las recombinasas FimBE, *fimS*, y algunos genes estructurales arreglados de manera similar. Se encontraron dos diferencias en *K. pneumoniae*, que son: la ausencia de un homólogo a una tercera recombinasa de *E. coli* (FimX) y la presencia de un probable regulador codificado inmediatamente corriente abajo del cluster *fim* (*fimK*). La eliminación de *fimK* provoca un aumento en la expresión de las fimbrias tipo I. Interesantemente, esta proteína tiene similitud con las fosfodiesterasas EAL, las cuales están involucradas en el metabolismo del segundo mensajero GMP-dicíclico (Rosen et al, 2008; Struve et al, 2008).

En *Salmonella Typhimurium* la regulación de las fimbrias tipo I la realizan la proteínas FimW, FimY y FimZ (Saini et al, 2009) y un tRNA (*fimU*) codificado corriente arriba de *fimW* que se requiere para la traducción efectiva de los genes reguladores (Swenson et al, 1994). FimZ posee un dominio señal y un dominio de unión a DNA asociado con ciertos reguladores de respuesta de sistemas de dos componentes, aunque su histidina cinasa asociada no se ha identificado. FimY no tiene dominios reconocidos y exhibe poca homología a proteínas en la base de datos, mientras que FimW posee un probable dominio de unión a DNA. FimY y FimZ activan independientemente la expresión del promotor de *fimA*, se activan fuertemente de manera recíproca, pero se autoregulan débilmente de manera positiva. Por su parte, FimW regula de manera negativa la expresión de *fim* reprimiendo la transcripción de *fimY* independientemente de FimY y FimZ, a su vez FimY activa la expresión de *fimW* (Saini et al, 2009).

Otro de los operones fimbriales cuya regulación se ha estudiado mucho es el operón *pap*. El control de la expresión de la subunidad mayor *papA* lo determina el estado de metilación de dos sitios GATC corriente arriba del promotor *papBA*. Además, las concentraciones del regulador global Lrp y el regulador específico PapI influyen su transcripción. A altas concentraciones intracelulares de Lrp y relativamente bajas concentraciones de PapI, Lrp se une eficientemente a la región del sitio GATC más cercano al promotor, lo que lleva a la inhibición de la transcripción. Esta unión sólo puede ocurrir si el sitio no está metilado, por lo tanto la unión de Lrp compite con la metilasa Dam por la unión a este sitio. A bajas concentraciones de Lrp y en presencia de PapI, Lrp se une al sitio GATC hemimetilado alejado del promotor, previniendo la metilación de este sitio por Dam pero permitiendo la metilación completa del segundo sitio proximal. En este

---

---

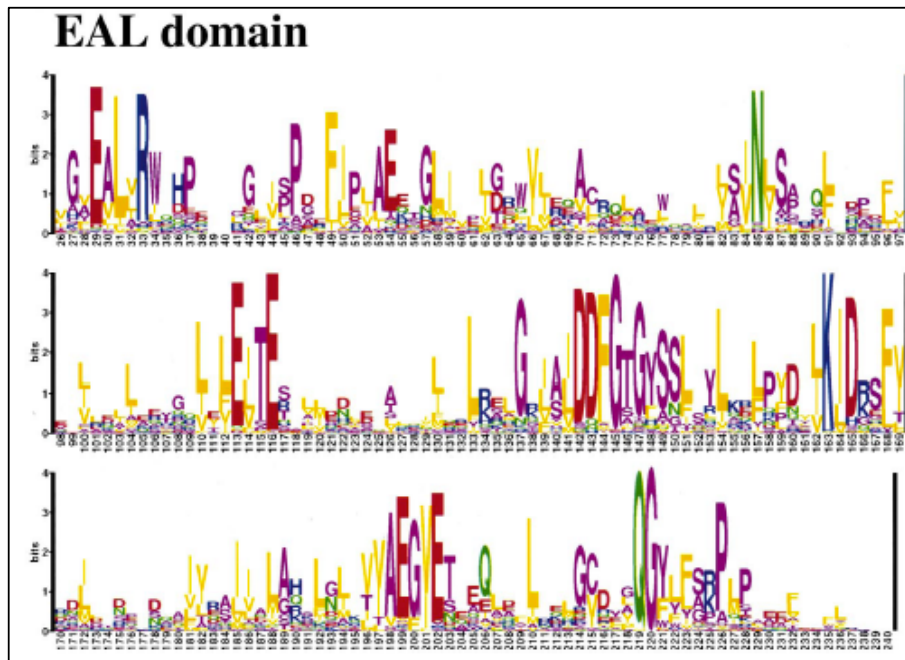
estado la transcripción del operón puede ocurrir (Peterson & Reich, 2006; Peterson & Reich, 2008).

### 1.10 Dominio EAL

El dominio EAL es un dominio de aproximadamente 250 aa que se encuentra en diversas proteínas bacterianas señalizadoras (Schmidt et al, 2005). Se le denomina EAL por uno de los motivos más conservados (Glu-Ala-Leu) (Fig. 10), aunque también se conoce como dominio de función desconocida 2 ó DUF2 (<http://smart.embl-heidelberg.de>). Fue descrito originalmente en un estudio de la proteína BvgR de *Bordetella pertussis* (Merkel et al, 1998). Se ha demostrado que este dominio está involucrado en la degradación del segundo mensajero GMP dicíclico, ya que tiene función de fosfodiesterasa (Galperin, 2004; Galperin et al, 2001). Cuando el dominio es funcional, degrada al GMP dicíclico en 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina, el cual a su vez es hidrolizado en dos moléculas de GMP. La actividad de fosfodiesterasa es estrictamente específica para GMP dicíclico (Schmidt et al, 2005) y requiere la adición de  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ , mientras que es inhibida por  $Ca^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  (Barends et al, 2009; Tamayo et al, 2005). Este dominio puede encontrarse como dominio único en una proteína o estar fusionado a otros dominios, por ejemplo: GGDEF (con actividad de diguanilato ciclasa), PAS (involucrado en detección de luz,  $O_2$  y potencial redox), GAF (dominio de unión a cGMP), CHASE (unión a ligandos de bajo peso molecular), REC (regulador de respuesta) y HTH (dominio de unión a DNA) (Galperin et al, 2001).

### 1.11 c-di-GMP

El GMP dicíclico está emergiendo como una molécula señalizadora novedosa y ampliamente distribuida (Ryjenkov et al, 2005). Es un segundo mensajero global que controla procesos celulares relacionados con la vida bacteriana en superficies que, por lo regular, involucran comportamiento multicelular, incluyendo formación de biopelículas (Bomchil et al, 2003; Garcia et al, 2004), motilidad (Boles & McCarter, 2002), desarrollo (Aldridge et al, 2003), regulación de expresión de genes (Thomas et al, 2004), etc. [revisado en (D'Argenio & Miller, 2004; Jenal, 2004)].



**Fig. 10.** Secuencia consenso del dominio EAL. La numeración corresponde a la proteína YdiV de *E.coli*. Tomado de Galperin *et al.*, 2001.

### 1.12 Familia LuxR

El primer gen del operón *ecp* codifica para una probable proteína reguladora que posee un dominio HTH característico de la familia LuxR. Las proteínas pertenecientes a esta familia están formadas por dos dominios funcionales (Nasser & Reverchon, 2007). En el extremo C-terminal se localiza el dominio HTH de unión a DNA, mientras que en el extremo N-terminal, que es altamente variable entre los miembros de la familia, contiene un dominio regulador que modula la actividad del C-terminal mediante varias modificaciones. Dependiendo del dominio N-terminal que posean, estos reguladores pueden activarse por uno de cuatro mecanismos diferentes: i) reguladores que pertenecen a sistemas de dos componentes, donde la proteína es activada por fosforilación, generalmente en un residuo de aspartato, como NarL de *E. coli* y FixJ de *Sinorhizobium meliloti*; ii) reguladores que son activados cuando se unen a moléculas señalizadoras de quorum-sensing (acil homoserín lactonas), como LuxR de *Vibrio fischeri*; iii) reguladores autónomos que carecen de un dominio regulador, como GerE de *Bacillus*

---

---

*subtilis*; y iv) reguladores que unen múltiples ligandos, como MalT de *E. coli*, la cual une ATP y maltotriosa. Muchos reguladores tipo LuxR actúan como activadores transcripcionales; sin embargo, algunos pueden ser represores o tener un papel dual dependiendo de dónde se localiza su sitio de unión. Los reguladores de esta familia comparten una organización similar de sus sitios blanco, ya que se unen a secuencias repetidas invertidas de entre 7 y 20 pb. Los reguladores tipo LuxR controlan diversas actividades en varios procesos biológicos y se sabe que se unen a DNA como dímeros.

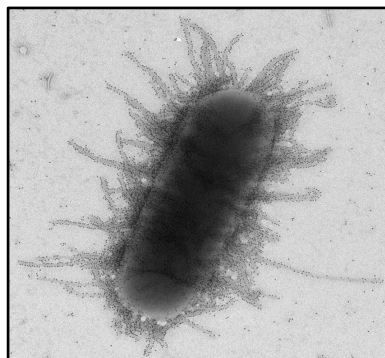
---

---

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 “*Escherichia coli* common pilus” (ECP)

Las fimbrias ECP (Fig. 11) fueron descritas por primera vez por Pouttu y colaboradores (2001), quienes identificaron un nuevo tipo de fimbrias en el grupo clonal 018acK1H7 de *E. coli* asociada a meningitis en neonatos (NMEC). Analizando una triple mutante IHE 3034-79 (*fimA::cat sfaA::Gm fliC::sat*) por microscopía electrónica de transmisión después de crecimiento a 20°C, detectaron la presencia de estructuras fimbriales morfológicamente similares a las fimbrias tipo I, las cuales no se detectaron después de crecimiento a 37°C. Sin embargo, como era de esperarse, esta cepa no aglutinó en antisuero dirigido contra fimbrias tipo I o S de la misma bacteria, indicando que estas fimbrias constituían un nuevo tipo. Las nuevas fimbrias tienen un diámetro de 5 a 7 nm y un largo de 0.4 a 5 µm. Debido a que la expresión de estas fimbrias se observó sólo en el principal grupo clonal de NMEC a baja temperatura, decidieron llamarlas fimbrias Mat (“meningitis associated and temperature-regulated”). Un análisis de SDS-PAGE de las fimbrias Mat purificadas reveló que el péptido principal, MatB, tiene un peso molecular de 18 kDa. La secuencia de este péptido no tiene homología con otras secuencias de proteínas fimbriales de cepas de *E. coli* patógenas o comensales, pero correlaciona perfectamente con la secuencia peptídica predicha de un gen de *E. coli* K12 llamado *yagZ*, el cual codifica una proteína hipotética de 195 aa.



**Fig. 11.** Fimbrias ECP. Microscopía electrónica de ECP de EPEC E2348/69 detectados con anti-ECP y anti-conejo acoplado a partículas de oro de 10 nm.

---

---

Posteriormente, Rendón y colaboradores (2007) descubrieron que cepas de EPEC y EHEC producen fimbrias nunca antes observadas para estas bacterias después de haber estado en contacto prolongado (> 3 hr) con cultivos de células epiteliales HEp-2 a 37°C. Estas fimbrias están compuestas de una proteína de 22 kDa cuyo N-terminal mostró 100% de identidad a la proteína codificada por el gen *matB/yagZ* presente en NMEC. Observaron que, bajo condiciones experimentales similares, cepas pertenecientes a otros patotipos de *E. coli* como ETEC, EAaggEC y EIEC, así como cepas de *E. coli* comensal aisladas de niños sanos, también poseen el gen *matB/yagZ* y producen estas fimbrias. Por lo anterior, se propuso llamarla ECP (“*E. coli* common pili”) y al gen de la subunidad principal *ecpA*. El análisis de la expresión de ECP *in vitro*, permitió determinar que, además de la inducción observada en presencia de células epiteliales, estas fimbrias también se expresan en DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”), el medio comúnmente utilizado para cultivo de células.

## 2.2 Operón *ecp*

El gen *ecpA* se encuentra en un cluster formado por 6 genes, los cuales tienen similitud a proteínas fimbriales (Fig. 12). Debido a esto, Pouttu y colaboradores (2001), analizaron el papel de estos genes en la formación del pilus, para lo cual complementan a la cepa IHE 3034-90 mutante en *matB* (*ecpA*) con distintas porciones del operón clonadas en el vector pSE380. Al analizar la producción del pilus por ELISA observan que en la mutante complementada con los genes *matC-orf123* (también llamados *ecpBCDE*) no se restaura la producción. Interesantemente, tampoco es restaurada cuando se complementa únicamente con *matB*. Al complementar con los plásmidos que contienen a *matB* y distintas combinaciones del resto de los genes, observan que la producción es restaurada; sin embargo, el nivel más alto se alcanza cuando complementan con *matBC* (*ecpAB*) o *matBC-orf1* (*ecpABC*), lo cual sugiere que las proteínas codificadas por estos genes son importantes para la estabilidad y ensamblaje de EcpA. Posteriormente, Lehti y colaboradores (2010) al analizar la producción de ECP en mutantes en cada uno de los genes, observaron que no hay producción de ECP en ninguna de ellas y la producción se restaura cuando las mutantes son complementadas con el respectivo gen, apoyando lo visto anteriormente.





**Fig. 12.** Representación esquemática del operón *ecp*. Este operón está formado por los genes *ecpRABCDE*, los cuales están conservados en varias cepas de *E. coli*, tanto patógenas como no patógenas, así como en *Klebsiella* y *Shigella* [GeConT (Ciria et al, 2004)].

El primer gen del operón codifica para EcpR (MatA/YkgK), una proteína de 196 aa que carece de una secuencia señal detectable y contiene un motivo HTH entre los residuos 145 y 195, característico de proteínas que se unen a DNA y con similitud a la firma de la familia de proteínas reguladoras que contienen el dominio HTH del tipo LuxR. Sin embargo, el dominio N-terminal no muestra similitud clara con ninguno de los reguladores clasificados en alguna de las categorías mencionadas anteriormente y que hayan sido caracterizados funcional o estructuralmente. Un análisis de BLAST reveló que la similitud más alta la comparte con las proteínas UhpA de *E. coli* y BD2139 de *Bdellovibrio bacteriovorus*. De éstas, sólo UhpA ha sido clasificada dentro de la familia de LuxR como un regulador que se activa por fosforilación; sin embargo, EcpR carece de la mayoría de los residuos que conforman el sitio activo de los reguladores de respuesta que son fosforilados por una histidín-cinasa.

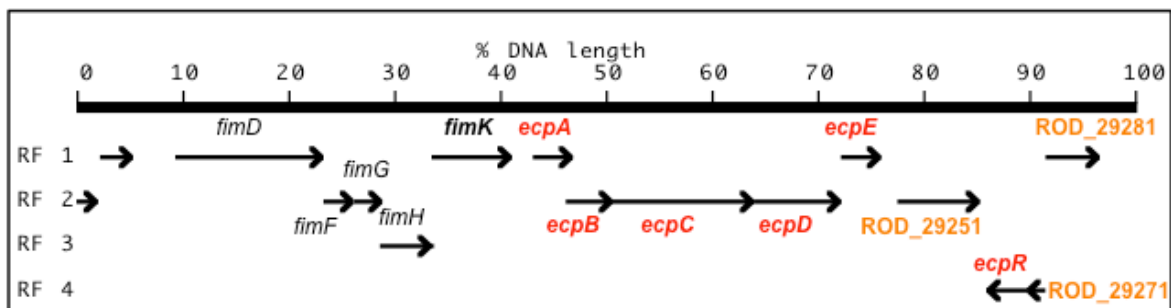
El segundo gen del operón, *ecpA*, codifica para EcpA (MatB o YagZ), la cual es una proteína de 195 aa que contiene una secuencia señal de 22 aa que no está relacionada a la secuencia líder de pilinas tipo IV y carece de los motivos típicos identificados en pilinas de *E. coli*. El C-terminal carece del motivo  $\beta$ -zipper reconocido por chaperonas fimbriales y de los residuos típicos de cisteína que forman puentes disulfuro (Rendon et al, 2007).

Las proteínas EcpB (MatC/YagY) y EcpE (MatF/YagV), codificadas por el tercer y sexto genes, respectivamente, son probables chaperonas periplásmicas de 222 y 236 aa,

respectivamente. Éstas poseen una secuencia señal y tienen similitud con proteínas chaperonas; sin embargo, carecen de los dominios tipo Ig presentes en las chaperonas PapD y FimC (Holmgren & Branden, 1989). EcpC (MatD/YagX) es una probable proteína de 841 aa que posee una secuencia señal y un dominio de proteína acomodadora fimbrial. EcpD (MatE/YagW), de 547 aa, tiene similitud con un probable receptor de *Vibrio cholerae* que a la fecha no ha sido caracterizado. Recientemente se reportó que esta proteína es capaz de polimerizar y de incorporarse normalmente en la punta de la fimbria, así como de formar fimbrias funcionales independientemente de EcpA (Garnett et al, 2012).

### 2.3 Operón *ecp* en *C. rodentium*

El operón *ecp* se encuentra conservado también en *C. rodentium*; sin embargo, en este caso tanto su localización en el cromosoma como su organización son diferentes a las de *E. coli*. Como se puede observar en el esquema de la Fig. 13, en *C. rodentium* el operón se localiza corriente abajo del operón *fim*, el cual codifica para la fimbria tipo I. Corriente arriba de *ecpA* se encuentra el gen *fimK*, el cual está ausente en *E. coli* pero presente en *Klebsiella pneumoniae* y *C. rodentium*. Por otro lado, en este caso el primer gen es *ecpA*, mientras que *ecpR* se localiza corriente abajo del operón, en orientación contraria y después de un probable gen denominado ROD\_29251, el cual codifica para una probable proteína que, al igual que FimK, contiene un dominio EAL.



**Fig. 13.** Representación esquemática del operón *ecp* de *C. rodentium*. El operón está localizado corriente abajo del operón *fim* (letras negras). Los genes *ecp* están indicados en rojo y en amarillo los genes no caracterizados: ROD\_29251- probable proteína que contiene un dominio EAL, ROD\_29271- probable lipoproteína, ROD\_29281- transposasa IS102.

A diferencia de lo que ocurre entre EPEC y EHEC, el porcentaje de identidad entre las proteínas de estas bacterias y las de *C. rodentium* es bajo (Tabla 3).

**Tabla 3.** Porcentaje de identidad entre las proteínas ECP de EPEC, EHEC y *C. rodentium*.

	Nombre	Longitud	Nombre	Longitud	%
<b>EcpA</b>	EcpA-EP	195	EcpA-EH	195	99
	EcpA-EP	195	EcpA-CR	197	48
	EcpA-EH	195	EcpA-CR	197	48
<b>EcpB</b>	EcpB-EP	222	EcpB-EH	222	97
	EcpB-EP	222	EcpB-CR	225	42
	EcpB-EH	222	EcpB-CR	225	42
<b>EcpC</b>	EcpC-EP	841	EcpC-EH	707	98
	EcpC-EP	841	EcpC-CR	828	43
	EcpC-EH	707	EcpC-CR	828	40
<b>EcpD</b>	EcpD-EP	547	EcpD-EH	547	99
	EcpD-EP	547	EcpD-CR	538	33
	EcpD-EH	547	EcpD-CR	538	33
<b>EcpE</b>	EcpE-EP	236	EcpE-EH	251	98
	EcpE-EP	236	EcpE-CR	233	33
	EcpE-EH	251	EcpE-CR	233	33
<b>EcpR</b>	EcpR-EP	196	EcpR-EH	196	99
	EcpR-EP	196	EcpR-CR	211	20
	EcpR-EH	196	EcpR-CR	211	20

## 2.4 Importancia de ECP

El papel de ECP en adherencia ha sido analizado en varias cepas de *E. coli* patógenas, así, sabemos que una mutante en *ecpA* de EHEC está disminuida en su capacidad de adherirse a células epiteliales en cultivo (Rendon et al, 2007). Así mismo, se ha visto que en la cepa de EPEC típica E2348/69, ECP se co-expresa con BFP y parece tener un papel en adherencia en cepas que carecen de BFP, EspA e intimina (Saldana et al, 2009). En el caso de cepas de EPEC atípicas (aEPEC), las cuales carecen del plásmido que codifica para BFP, en estudios independientes se ha visto que más del 80% contienen al gen *ecpA* (Hernandes et al, 2011; Scaletsky et al, 2010) y aproximadamente el 36% expresa a ECP (Hernandes et al, 2011). Esto sugiere que posiblemente ECP, junto con otras adhesinas, sustituya a BFP y permita a las bacterias adherirse al epitelio

---

---

intestinal. En ETEC se ha visto que 80% de las cepas analizadas poseen el gen *ecpA*, y de un subconjunto de 43 cepas 58% producen ECP, lo que sugiere que ECP es un factor de adherencia importante para ETEC, especialmente para aquellas cepas que no producen factores de colonización (Blackburn et al, 2009). En EAggEC se encontró que 96% de las cepas poseen el gen *ecpA*, y de éstas 63% producen ECP cuando se crecen en cultivos de células epiteliales. Al analizar el papel de ECP en la adherencia de una cepa que no posee la fimbria AAF, la cual es la principal adhesina de EAggEC, y que tiene mutado el gen *ecpA*, se vio que ésta es significativamente reducida. Este resultado sugiere que ECP tiene un papel potencial en la adherencia de cepas de EAggEC que carecen de las AAFs (Avelino et al, 2010).

Además de estar involucradas en adherencia, las fimbrias ECP también tienen un papel en formación de biopelículas, como lo demostraron Lehti y colaboradores (2010) para las cepas asociadas a meningitis. En EHEC ECP, junto con el curli, juega también un papel importante en la colonización de hojas de espinacas, junto con el flagelo, el SST3 y otras fimbrias como HCP (Saldana et al, 2011) y para la cepa comensal de *E. coli* Nissle 1917, en la colonización del intestino de ratones infantiles (Lasaro et al, 2009).

A pesar del alto grado de conservación del operón *ecp* en los distintos patotipos de *E. coli*, las condiciones que favorecen su expresión no son las mismas en todos ellos. Por ejemplo, la condición de crecimiento que favorece la expresión de *ecp* en EPEC y EHEC es el medio DME a 26°C ó 37°C (Rendon et al, 2007), mientras que para NMEC es el crecimiento en medio LB a 20°C (Pouttu et al, 2001) y para ETEC es el medio PPLO a 37°C (Blackburn et al, 2009). En lo referente a la regulación, recientemente se ha visto que el operón *ecp* está regulado de manera positiva por el regulador de respuesta RcsB, el cual se une directamente al DNA en una caja RcsB localizada en la región reguladora de *ecpR*. Al parecer, la regulación mediada por EcpR es dependiente de RcsB, ya que al sobre expresar a EcpR en una cepa mutante en RcsB no se ve un incremento en la expresión de una fusión transcripcional. Aunque RcsB es parte de un sistema de fosforelevo que incluye a las proteínas RcsC, RcsD y a la proteína accesoria RcsA, ninguna de éstas tiene efecto sobre la expresión de *ecp* (Lehti et al, 2012b). Se ha visto que EcpR no sólo regula la expresión del operón *ecp*, sino también la del operón *flhDC*, el cual codifica para el regulador maestro FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>, requerido para la expresión de los otros genes del regulón flagelar. En este caso, la regulación mediada por EcpR tiene un efecto

---

---

negativo, ya que su sobre expresión reduce la expresión de FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> y por lo tanto de la flagelina, lo cual se debe a la unión de la proteína cerca de la región promotora (Lehti et al, 2012a).

### 3. HIPÓTESIS

Los genes *ecpRABCDE* constituyen un operón cuya expresión es regulada positivamente por EcpR, el producto del primer gen del operón, y por reguladores globales en respuesta a condiciones ambientales particulares a las que se expone la bacteria durante su interacción con el hospedero. Dicha regulación se lleva a cabo por la interacción de estos reguladores con elementos de control presentes en la región reguladora del operón.

### 4. OBJETIVOS

**General:** Analizar la regulación, biogénesis y papel en adherencia de la fimbria ECP de EPEC y EHEC.

**Particular:** Analizar la regulación del operón *ecp* en EPEC y EHEC.

**Específicos:**

1. Analizar la regulación transcripcional de los genes *ecp*.
2. Determinar la función de EcpR.
3. Analizar el papel de reguladores globales en la expresión del operón *ecp*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas y los plásmidos utilizados en este estudio se enlistan en la Tabla 4. Se usaron los medios LB (Luria-Bertani, contiene 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl por litro, ajustado a pH 7.5 con NaOH) y DME (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”, Gibco BRL Life Technologies, que contiene alta glucosa, L-glutamina e hidrocloreuro de piridoxina), los cuales se suplementaron según lo requerido con los siguientes antibióticos: ampicilina (100 µg/ml), ácido nalidíxico (25 µg/ml), estreptomina (100 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml).

**Tabla 4.** Cepas y plásmidos utilizados.

CEPAS	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
E2348/69	EPEC silvestre O127:H6	Sm <sup>r</sup> (Levine et al, 1978)
JPEP36	E2348/69 $\Delta hns::Km$	Nal <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> (Garcia-Angulo et al, 2012)
JPEP45	E2348/69 $\Delta himA::Km$	Km <sup>r</sup> (Garcia-Angulo et al, 2012)
JPEP44	E2348/69 $\Delta fis::Km$	Km <sup>r</sup> (Garcia-Angulo et al, 2012)
JPEP47	E2348/69 $\Delta hha::Km$	Km <sup>r</sup> (Garcia-Angulo et al, 2012)
JPEP40	E2348/69 $\Delta stpA::Km$	Km <sup>r</sup> (Garcia-Angulo et al, 2012)
E2348/69	E2348/69 con una inserción $ecpR::Km$	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Este estudio
$\Delta ecpR::Km$		
E24348/69	E2348/69 con una inserción $ecpA::Km$	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> (Saldana et al, 2009)
$\Delta ecpA::Km$		
E24348/69	E2348/69 con una inserción $ecpB::Km$	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Este estudio
$\Delta ecpB::Km$		
E24348/69	E2348/69 con una inserción $ecpC::Km$	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Este estudio
$\Delta ecpC::Km$		
E24348/69	E2348/69 con una inserción $ecpD::Km$	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Este estudio
$\Delta ecpD::Km$		
E24348/69	E2348/69 con una inserción $ecpE::Km$	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Este estudio
$\Delta ecpE::Km$		
E24348/69	E2348/69 con una inserción $ecpABCDE::Km$	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Este estudio
$\Delta ECP::Km$		
E2348/69	E2348/69 que expresa EcpR-3X-FLAG	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Este estudio
$ecpR::3X-FLAG-kan$		

E2348/69 <i>ecpA::3X-FLAG-kan</i>	E2348/69 que expresa EcpA-3X-FLAG	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este estudio
E2348/69 <i>ecpB::3X-FLAG-kan</i>	E2348/69 que expresa EcpB-3X-FLAG	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este estudio
E2348/69 <i>ecpC::3X-FLAG-kan</i>	E2348/69 que expresa EcpC-3X-FLAG	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este estudio
E2348/69 <i>ecpD::3X-FLAG-kan</i>	E2348/69 que expresa EcpD-3X-FLAG	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este estudio
E2348/69 <i>ecpE::3X-FLAG-kan</i>	E2348/69 que expresa EcpE-3X-FLAG	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este estudio
EDL933	EHEC silvestre O157:H7		(Riley et al, 1983)
EDL933 $\Delta$ <i>ecpR::Km</i>	EDL933 con una inserción <i>ecpR::Km</i>	Km <sup>r</sup>	Este estudio
EDL933 $\Delta$ <i>ecpR</i>	Derivada de la EDL933 $\Delta$ <i>ecpR::Km</i> a la que se le eliminó el casete de Km		Este estudio
EDL933 $\Delta$ <i>ecpA::Km</i>	EDL933 con una inserción <i>ecpA::Km</i>	Km <sup>r</sup>	(Rendon et al, 2007)
EDL933 $\Delta$ <i>hns::Km</i>	EDL933 con una inserción <i>hns::Km</i>	Km <sup>r</sup>	Este estudio
EDL933 $\Delta$ <i>himA::Km</i>	EDL933 con una inserción <i>himA::Km</i>	Km <sup>r</sup>	Este estudio
MC4100	F <sup>-</sup> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> ) U169 <i>rpsL150 relA1 flb5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	Sm <sup>r</sup>	(Casadaban, 1976)
JPMC1	MC4100 con una inserción <i>hns::Km</i>	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	(Barba et al, 2005)
JPMC2	MC4100 con una inserción <i>himA::Km</i>	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	(Bustamante et al, 2011)
JPMC35	MC4100 con una eliminación en fase de <i>hns</i> y una inserción <i>himA::Km</i>	Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	(Bustamante et al, 2011)
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169 (F80 lacZDM15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Nal <sup>r</sup>	Invitrogen
DBS100	<i>C. rodentium</i> silvestre		(Schauer & Falkow, 1993)
DBS100 <i>ecpA::3X-FLAG-kan</i>	DBS100 que expresa EcpA-3X-FLAG	Km <sup>r</sup>	Este estudio
DBS100 <i>ecpR::3X-FLAG-kan</i>	DBS100 que expresa EcpR-3X-FLAG	Km <sup>r</sup>	Este estudio
DBS100 $\Delta$ <i>ecpR::Km</i>	DBS100 con una inserción <i>ecpR::Km</i>	Km <sup>r</sup>	Este estudio
DBS100 $\Delta$ <i>ecpR</i>	Derivada de la DBS100 $\Delta$ <i>ecpR::Km</i> a la que se le eliminó el casete de Km		Este estudio
DBS100 $\Delta$ <i>ecpR, ecpA::3X-FLAG-kan</i>	DBS100 con una inserción <i>ecpR::Km</i> y que expresa EcpA-FLAG	Km <sup>r</sup>	Este estudio
DBS100 $\Delta$ <i>fimK::Km</i>	DBS100 con una inserción <i>fimK::Km</i>	Km <sup>r</sup>	Este estudio

DBS100 $\Delta rod\_29251::Km$	DBS100 con una inserción <i>rod_29251::Km</i>	Km <sup>r</sup>	Escalera, A. (tesis licenciatura)
DBS100 <i>ecpA::3X-FLAG-kan</i> , $\Delta fimK::Cm$	DBS100 que expresa <i>EcpA-3X-FLAG</i> con una inserción <i>fimK::Cm</i>	Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	Este estudio
DBS100 <i>ecpA::3X-FLAG-kan</i> , $\Delta rod\_29251::Cm$	DBS100 que expresa <i>EcpA-3X-FLAG</i> con una inserción <i>rod_29251::Cm</i>	Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	Este estudio
DBS100 $\Delta himA::Km$	DBS100 con una inserción <i>himA::Km</i>	Km <sup>r</sup>	Este estudio
<b>PLASMIDOS</b>			
pKD46	Contiene el sistema de la recombinasa $\lambda$ Red bajo el promotor de <i>araB</i>		(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD4	Plásmido templado con el casete de Km		(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD3	Plásmido templado con el casete de Cm		(Datsenko & Wanner, 2000)
pCP20	Plásmido con la recombinasa FLP		(Datsenko & Wanner, 2000)
pSUB11	Plásmido templado que contiene 3xFLAG y el casete de Km		(Uzzau et al, 2001)
pKK232-8	Derivado del pBR322, contiene el gen reportero <i>cat</i> (cloranfenicol acetil transferasa) sin promotor		Pharmacia Biotech
pecpR-1H	Fusión transcripcional <i>ecpR-cat</i> de EHEC de la posición -591 a +198 con respecto al sitio de inicio de la transcripción		Este estudio
pecpR-1P	Fusión transcripcional <i>ecpR-cat</i> de EPEC de la posición -591 a +198 con respecto al sitio de inicio de la transcripción		Este estudio
pecpR-3	Fusión transcripcional <i>ecpR-cat</i> de la posición -379 a +198		Este estudio
pecpR-4	Fusión transcripcional <i>ecpR-cat</i> de la posición -288 a +198		Este estudio
pecpR-4m1	Fusión <i>ecpR-4</i> con las bases -212 a -208 cambiadas de ATTCC a CGGAA		Este estudio
pecpR-4m2	Fusión <i>ecpR-4</i> con las bases -194 a -191 cambiadas de CAAA a ACCC		Este estudio
pecpR-4m3	Fusión <i>ecpR-4</i> con las bases -198 a -187 cambiadas de AGGGCAAAGTTC a CTTTACCCTGGA		Este estudio
pecpR-4m4	Fusión <i>ecpR-4</i> con las bases -189 a -186 cambiadas de TTCC a GGAA		Este estudio
pecpR-4IRm1	Fusión <i>ecpR-4</i> con las bases -97 a -92 cambiadas de CAATAT a GGATCC		Este estudio
pecpR-4IRm2	Fusión <i>ecpR-4</i> con las bases -100 a -89 cambiadas de AAGCAATATTTT a GGGGCGCACCGG		Este estudio
pecpR-5	Fusión transcripcional <i>ecpR-cat</i> de la posición -236 a +198		Este estudio
pecpR-5m	Fusión <i>ecpR-5</i> con las bases -220 a -213 cambiadas de TTAAGACT a GGCCTCAG		Este estudio
pecpR-6	Fusión transcripcional <i>ecpR-cat</i> de la posición -211 a +198		Este estudio



pecpR-8	Fusión transcripcional <i>ecpR-cat</i> de la posición -188 a +198	Este estudio
pecpR-9	Fusión transcripcional <i>ecpR-cat</i> de la posición -103 a +198	Este estudio
pecpR-10	Fusión transcripcional <i>ecpR-cat</i> de la posición -66 a +198	Este estudio
pecpR-11	Fusión transcripcional <i>ecpR-cat</i> de la posición -38 a +198	Este estudio
pecpR-12	Fusión transcripcional <i>ecpR-cat</i> de la posición -6 a +198	Este estudio
pecpR-13	Fusión transcripcional <i>ecpR-cat</i> de la posición +26 a +198	Este estudio
pecpR-14	Fusión transcripcional <i>ecpR-cat</i> de la posición +75 a +198	Este estudio
pecpRA-P	Fusión transcripcional <i>ecpRA-cat</i> de EPEC de la posición -288 con respecto al sitio de inicio de la transcripción a +22 con respecto al codón de inicio de <i>ecpA</i>	Este estudio
pecpRA-H	Fusión transcripcional <i>ecpRA-cat</i> de EHEC de la posición -288 con respecto al sitio de inicio de la transcripción a +22 con respecto al codón de inicio de <i>ecpA</i>	Este estudio
pecpΔRA	Fusión transcripcional <i>ecpΔRA-cat</i> de EHEC similar a la fusión <i>ecpRA</i> pero con una eliminación de los codones 13 a 86 de <i>ecpR</i>	Este estudio
pecpΔRA-40	Derivado del <i>pecpΔRA</i> con un recorte de 34 pb en el extremo 3'	Este estudio
pecpΔRA-80	Derivado del <i>pecpΔRA</i> con un recorte de 73 pb en el extremo 3'	Este estudio
pecpΔRA-120	Derivado del <i>pecpΔRA</i> con un recorte de 113 pb en el extremo 3'	Este estudio
pecpΔRA-mut	Derivado del <i>pecpΔRA</i> con las últimas 5 bases cambiadas de GGCAA a AAAAA	Este estudio
pecpΔRA+80	Derivado del <i>pecpΔRA</i> más 61 pb en el extremo 3'	Este estudio
pecpA-270	Fusión transcripcional <i>ecpA-cat</i> de la posición -270 a +22 con respecto al codón de inicio de <i>ecpA</i>	Este estudio
pecpA-180	Fusión transcripcional <i>ecpA-cat</i> de la posición -180 a +22 con respecto al codón de inicio de <i>ecpA</i>	Este estudio
pecpA-80	Fusión transcripcional <i>ecpA-cat</i> de la posición -80 a +22 con respecto al codón de inicio de <i>ecpA</i>	Este estudio
pecpA-582	Fusión transcripcional <i>ecpA-cat</i> de <i>C. rodentium</i> de la posición -582 a +198 con respecto al codón de inicio de <i>ecpA</i>	Este estudio
pecpR-567	Fusión transcripcional <i>ecpR-cat</i> de <i>C. rodentium</i> de la posición -567 a +198 con respecto al codón de inicio de <i>ecpR</i> . Incluye el gen ROD_29271 completo y 116 pb corriente arriba de su ATG	Este estudio
pMPM-T3	Vector de clonación de bajo número de copias derivado del p15A, Tc <sup>r</sup>	(Mayer, 1995)
pT3-EcpR-400	Derivado del pMPM-T3 que lleva <i>ecpR::3xFLAG</i> más la región reguladora hasta la posición -288 con respecto al sitio de inicio de la transcripción	Este estudio
pT3-400EcpR-D60A	Derivado del pT3-EcpR-400 que expresa EcpR D60A	Este estudio
pT3-400EcpR-G159A	Derivado del pT3-EcpR-400 que expresa EcpR G159A	Este estudio

pT3-400EcpR-N170K-T175A	Derivado del pT3-EcpR-400 que expresa EcpR N170K-T175A	Este estudio
pT3-400EcpR-T175A	Derivado del pT3-EcpR-400 que expresa EcpR T175A	Este estudio
pT3-400EcpR-V176A	Derivado del pT3-EcpR-400 que expresa EcpR V176A	Este estudio
pT3-400EcpR-V176A-Q196L	Derivado del pT3-EcpR-400 que expresa EcpR V176A-Q196L	Este estudio
pT3-400EcpR-K186A	Derivado del pT3-EcpR-400 que expresa EcpR K186A	Este estudio
pT3-EcpR	Derivado del pT3-EcpR-400 que lleva la región reguladora hasta la posición -59 con respecto al sitio de inicio de la transcripción	Este estudio
pT3-EcpR-D60A	Derivado del pT3-400EcpR-D60A que lleva la región reguladora hasta la posición -59 con respecto al sitio de inicio de la transcripción	Este estudio
pT3-EcpR-G159A	Derivado del pT3-400EcpR-G159A que lleva la región reguladora hasta la posición -59 con respecto al sitio de inicio de la transcripción	Este estudio
pT3-EcpR-N170K-T175A	Derivado del pT3-400EcpR-N170K-T175A que lleva la región reguladora hasta la posición -59 con respecto al sitio de inicio de la transcripción	Este estudio
pT3-EcpR-T175A	Derivado del pT3-400EcpR-T175A que lleva la región reguladora hasta la posición -59 con respecto al sitio de inicio de la transcripción	Este estudio
pT3-EcpR-V176A	Derivado del pT3-400EcpR-V176A que lleva la región reguladora hasta la posición -59 con respecto al sitio de inicio de la transcripción	Este estudio
pT3-EcpR-V176A-Q196L	Derivado del pT3-400EcpR-V176A-Q196L que lleva la región reguladora hasta la posición -59 con respecto al sitio de inicio de la transcripción	Este estudio
pT3-EcpR-K186A	Derivado del pT3-400EcpR-K186A que lleva la región reguladora hasta la posición -59 con respecto al sitio de inicio de la transcripción	Este estudio
pMPM-K3	Vector de bajo número de copias, derivado del p15, Km <sup>r</sup>	(Mayer, 1995)
pK3-EcpR-400	Derivado del pMPM-K3 que lleva <i>ecpR::3xFLAG</i> hasta la posición -288 con respecto al sitio de inicio de la transcripción.	Este estudio
pBAD/MycHis	Derivado del pBR322 que contiene un epítotope <i>myc</i> y una región 6His	Invitrogen
pGTG	Derivado del pBAD/MycHis que expresa EcpR-MycHis	Este estudio
p6H-EcpR-MH	Derivado del pBAD/MycHis que expresa 6H-EcpR-MycHis	Este estudio
p6H-ΔN129-MH	p6H-EcpR-MH con una eliminación de los residuos 1-129	Este estudio
p6H-ΔN110-MH	p6H-EcpR-MH con una eliminación de los residuos 1-110	Este estudio
p6H-ΔN85-MH	p6H-EcpR-MH con una eliminación de los residuos 1-85	Este estudio
pMDH-NS	Derivado del pBAD-MycHis que expresa a H-NS-MycHis	(De la Cruz et al, 2007)
pecpA-MH	Derivado del pBAD-MycHis que expresa a EcpA-MycHis	Este estudio
pecpA	Derivado del pBAD-MycHis que expresa a EcpA	Este estudio
pecpB-MH	Derivado del pBAD-MycHis que expresa a EcpB-MycHis	Este estudio
pecpB	Derivado del pBAD-MycHis que expresa a EcpB	Este estudio
pecpC-MH	Derivado del pBAD-MycHis que expresa a EcpC-MycHis	Este estudio
pecpC	Derivado del pBAD-MycHis que expresa a EcpC	Este estudio

pecpD-MH	Derivado del pBAD-MycHis que expresa a EcpD-MycHis	Este estudio
pecpD	Derivado del pBAD-MycHis que expresa a EcpD	Este estudio
pecpE-MH	Derivado del pBAD-MycHis que expresa a EcpE-MycHis	Este estudio
pecpE	Derivado del pBAD-MycHis que expresa a EcpE	Este estudio
pMPM-T6	Derivado del vector de clonación p15A de alto número de copias	(Mayer, 1995)
pT6-ABC	Derivado del pMPM-T6 que expresa a EcpABC	Este estudio
pT6-CDE	Derivado del pMPM-T6 que expresa a EcpCDE	Este estudio
pT6-DE	Derivado del pMPM-T6 que expresa a EcpDE	Este estudio

## 5.2 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados se sintetizaron en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología-UNAM y se enlistan en la Tabla 5. Todos los oligonucleótidos se diluyeron a una concentración de 25  $\mu$ M.

Los oligonucleótidos pKK232-BHI-F, ecpR-3R (utilizados en los “footprinting *in vivo*”) y ecpR-Rev (utilizado en las reacciones de “primer extension”) se marcaron con [ $^{32}$ P]- $\gamma$ ATP y con la enzima T4 polinucleótido cinasa (Amersham) incubando por media hora a 37°C.

**Tabla 5.** Oligonucleótidos utilizados.

OLIGO	SECUENCIA 5'-3'	CARACTERÍSTICAS	USO
ecpR-700F	CAT-AAA-AAC-GGA-TCC-GCC-ACA-GGA	Contiene un sitio BamHI, Fwd	ecpR-1
ecpR-600F	CAA-AGA-GGG-GAT-CCT-TCC-TGT-GAC	Contiene un sitio BamHI, Fwd	ecpR-2
ecpR-500F	GTT-TAA-TTT-TGG-ATC-CCT-TAT-TGG	Contiene un sitio BamHI, Fwd	ecpR-3
ecpR-400F	CTT-TAA-TGA-GGA-TCC-ATG-ATA-GTT	Contiene un sitio BamHI, Fwd	ecpR-4
upEBS-F	ACA-CAT-TAA-GAC-TCG-GAA-TAA-CAC -CTC-AGG-G	Fwd	ecpR-4m1
upEBS-R	CCC-TGA-GGT-GTT-ATT-CCG-AGT-CTT -AA-TGT-GT	Rev	ecpR-4m1
EBSm2-R	TTT-ATA-TTA-GCC-AGG-AAC-GGG-TCC -CTG-AGG-TGT-TAG-GAA-T	Rev	ecpR-4m2
pKKA59F	CTG-TTG-TTT-GTC-GGT-GAA-CG	Rev	ecpR-4m2
EBSm2-F	ATT-CCT-AAC-ACC-TCA-GGG-ACC-CGT -TCC-TGG-CTA-ATA-TAA-A	Fwd	ecpR-4m2
EBS-F	ACT-ATT-CCT-AAC-ACC-TCC-TTT-ACC -CTG-GAC-TGG-CTA-ATA-TAA-AAT-G	Fwd	ecpR-4m3
EBS-R	CAT-TTT-ATA-TAT-GCC-AGT-CCA-GGG -TAA-AGG-AGG-TGT-TAG-GAA-TAG-T	Rev	ecpR-4m3

ecpRm4-F	CAC-CTC-AGG-GCA-AAG-GGA-ATG-GCT -AAT-ATA-AAA-TGC	Fwd	ecpR-4m4
ecpR-m4R	GCA-TTT-TAT-ATT-AGC-CAT-TCC-CTT -TGC-CCT-GAG-GTG	Rev	ecpR-4m4
IFHBS-F	TCT-TCT-TAT-CAA-AAA-AGG-GAT-CCT TTC-ATT-TTT-TGT-AAA-T	Fwd	ecpR-4IR1
IHFBS-R	ATT-TAC-AAA-AAA-TGA-AAG-GAT-CCC TTT-TTT-GAT-AAG-AAG-A	Rev	ecpR-4IR1
IHFm-F	CTT-TTT-CTT-CTT-ATC-AAA-AGG-GGC GCA-CCG-GCA-TTT-TTT-GTA-AAT-ATT G	Fwd	ecpR-4IR2
IHFm-R	CAA-TAT-TTA-CAA-AAA-ATG-CCG-GTG CGC-CCC-TTT-TGA-TAA-GAA-GAA-AAA G	Rev	ecpR-4IR2
ecpR-350F	GTT-TTT-TTA-CGG-ATC-CAT-TAC-ACA	Contiene un sitio BamHI, Fwd	ecpR-5
ecpR-325F	CAT-TGG-ATC-CAT-TCC-TAA-CAC-CTC -AGG	Contiene un sitio BamHI, Fwd	ecpR-6
ecpR-300F	TCA-GGG-CAA-GGA-TCC-TGG-CTA-ATA	Contiene un sitio BamHI, Fwd	ecpR-8
ecpR-200F	CTT-TTT-CTT-CGG-ATC-CAA-AAA-GCA	Contiene un sitio BamHI, Fwd	ecpR-9
ecpR-190F	ATA-TGG-ATC-CAA-CCA-TGG-AAT-TCA -TTT-TC	Contiene un sitio BamHI, Fwd	ecpR-10
ecpR-160F	CTG-TGG-ATC-CAT-TGA-CAC-TCA-TCA -GGA-A	Contiene un sitio BamHI, Fwd	ecpR-11
ecpR-130F	ACA-TGG-ATC-CAA-ACC-TAA-TCG-AAA -TAA-T	Contiene un sitio BamHI, Fwd	ecpR-12
ecpR-100F	TAA-AAC-TGG-ATC-CCG-TTT-AAC-CTA	Contiene un sitio BamHI, Fwd	ecpR-13
ecpR-50F	ATT-TAC-TTC-GGA-TCC-ACT-AAA-GAA	Contiene un sitio BamHI, Fwd	ecpR-14
ecpR-1R	TGG-GGA-GAC-AAG-CTT-TAT-TTA-TCA	Contiene un sitio HindIII, Rev	Fusiones de <i>ecpR</i>
ecpA-270F	TGG-CCT-ATG-GGA-TCC-ATG-GCA-GGT	Contiene un sitio BamHI, Fwd	ecpA-270
ecpA-180F	CTC-AGG-GAA-GGA-TCC-CTA-AAT-CGA	Contiene un sitio BamHI, Fwd	ecpA-180
ecpA-80F	ATA-TAA-GTT-GGA-TCC-GTA-AAC-TCC	Contiene un sitio BamHI, Fwd	ecpA-80
ecpA-Rev	CCG-TTA-CCA-AAG-CTT-TTG-CCA-GAA	Contiene un sitio HindIII, Rev	Fusiones de <i>ecpA</i>
ecpA-Rev-40	TTC-CAA-GCT-TGA-ATT-GAG-GAC-ATG -AAG	Contiene un sitio HindIII, Rev	ecpΔRA-40
ecpA-Rev-80	TTT-TAA-GCT-TCT-AAC-TTG-CCT-GGA -GTT	Contiene un sitio HindIII, Rev	ecpΔRA-80
ecpA-Rev-120	TAT-AAA-GCT-TTG-AGT-ACA-GCA-TAT -GAA	Contiene un sitio HindIII, Rev	ecpΔRA-120
pKK-8-BHI-F	GGA-ATT-CTC-GGG-GAT	Incluye parte del pKK y el sitio de BamHI, Fwd	secuenciación de fusiones
pKK-8-H3-R	GTT-TTG-TCC-TAC-TCA-AGC	Incluye parte del pKK y el sitio de HindIII, Rev	secuenciación de fusiones
ecpR-Rev	TCA-TAG-TCC-CTG-CTG-TAA-TCA	Rev	"Primer extension"

ecpR-P1	GCA-GAG-GCC-AAG-CTG-TAC-TCA-AAA -TTA-TAT-AAG-TTG-GTT-CAG-GAC- TAC-AAA-GAC-CAT-GAC-GG	Fwd	Etiquetar a <i>ecpR</i> con 3xFLAG
ecpR-P2	GAA-GTC-CCG-GTG-AGT-CAT-TTT-TAA -AAC-TAA-CTT-GCC-TGG-AGT-CAT- ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Etiquetar a <i>ecpR</i> con 3xFLAG
Km-SstI-R	AAG-CGG-CCG-GAG-CTC-CTG-CGT-GCA	Reconoce al casete de Km y contiene un sitio Sacl, Rev	Clonar a <i>ecpR</i> -FLAG en pMPM-T3 y pMPM-K3
G64	GCC-TGG-AGT-TTA-CTG-AAC-CAA-CTT -ATA-TAA-TTT-TGA-GTA-CAG-CAT- ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Fwd	Mutagénesis de <i>ecpR</i>
G65	AAA-GTA-GTG-ACA-TGG-CAA-AAT-GAT -TAC-AGC-AGG-GAC-TAT-GAG-TGT- AGG-CTG-GAG-CTG-CTT-CG	Rev	Mutagénesis de <i>ecpR</i>
G92	ACC-TAT-ATT-GAT-ATG-TGC-TAC-G	Fwd	Checar mutante $\Delta$ <i>ecpR</i>
G93	CGT-TAC-CAG-AGC-TAT-TGC-CAG	Rev	Checar mutante $\Delta$ <i>ecpR</i>
rpoN-H1P1	GAG-AGT-ACG-ATT-CTG-AAC-ATG-AAG -CAA-GGT-TTG-CAA-CTC-AGG-TGT- AGG-CTG-GAG-CTG-CTT-CG	Fwd	Mutagénesis de <i>rpoN</i>
rpoN-H2P2	TCT-TCC-TTA-TCG-GTT-GGG-TCA-AAC -GAG-TTG-TTT-ACG-CTG-GTT-CAT- ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Mutagénesis de <i>rpoN</i>
rpoN-F	CGA-ATC-CGA-AAT-TTA-TTC-TGC	Fwd	Checar mutante $\Delta$ <i>rpoN</i>
rpoN-R	TTC-AGT-TTA-TCT-TTA-TGT-TTG-G	Rev	Checar mutante $\Delta$ <i>rpoN</i>
hns-H1P1	CAC-CCC-AAT-ATA-AGT-TTG-AGA-TTA -CTA-CAA-TGA-GCG-AAG-CTG-TAG- GCT-GGA-GCT-GCT-TCG	Fwd	Mutagénesis de <i>hns</i>
hns-H2P2	GAT-TTT-AAG-CAA-GTG-CAA-TCT-ACA -AAA-GAT-TAT-TGC-TTC-ATA-TGA- ATA-TCC-TCC-TTA-G	Rev	Mutagénesis de <i>hns</i>
hns-M	TGC-TGC-GAG-CTC-ATC-GGT-GTA-A	Fwd	Checar mutante $\Delta$ <i>hns</i>
hns-O	GCC-TAT-CAT-ATG-AAA-GGG-AAG	Rev	Checar mutante $\Delta$ <i>hns</i>
stpA-H1P1	TTT-TTT-TGT-TTT-GGC-GTT-AAA-AGG -TTT-TCT-TTA-TTA-TGT-CTG-TAG- GCT-GGA-GCT-GCT-TCG	Fwd	Mutagénesis de <i>stpA</i>
stpA-H2P2	GAC-GCG-CCC-TAG-CAG-CGA-CAT-CCG -GCC-TCA-GTA-ATT-ACA-TAT-GAA- TAT CCT-CCT-TAG	Rev	Mutagénesis de <i>stpA</i>
stpA-F	CTT-TGA-TTT-TGT-CAG-GCT-TGC-GG	Fwd	Checar mutante $\Delta$ <i>stpA</i>
stpA-R	GAA-GAA-GAA-GTT-TAT-TTT-GCG-CG	Rev	Checar mutante $\Delta$ <i>stpA</i>

himA-H1P1	ATG-GCG-CTT-ACA-AAA-GCT-GAA-ATG -TCA-GAA-TAT-CTG-TTT-GAT-TGT- AGG CTG GAG CTG CTT CG	Fwd	Mutagénesis de <i>himA</i>
himA-H2P2	CTT-TTT-AGT-TAG-ATC-AGA-TTA-CTC -CGT-TTT-GGG-CGA-AGC-GTT-CAT- ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Mutagénesis de <i>himA</i>
himA-F	AAG-GGT-GTT-GCG-GAG-GGG-TAT	Fwd	Checar mutante $\Delta$ <i>himA</i>
himA-R	CAA-AAC-TGA-CAG-GCA-TAA-TAA	Rev	Checar mutante $\Delta$ <i>himA</i>
hha-H1P1	AGT-ATG-TCC-GAA-AAA-CCT-TTA-ACG -AAA-ACC-GAT-TAT-TTA-ATG-TGT- AGG-CTG-GAG-CTG-CTT-CG	Fwd	Mutagénesis de <i>hha</i>
hha-H2P2	TTA-TTA-GCG-AAT-AAA-TTT-CCA-TAC -TGA-GGA-AGG-GAT-CTT-GTC-CAT- ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Mutagénesis de <i>hha</i>
hha-F	AAG-TCA-GGT-AAT-CGA-CTA-TTC	Fwd	Checar mutante $\Delta$ <i>hha</i>
hha-R	CAT-CTG-TGT-GAT-AAA-GAT-CAC	Rev	Checar mutante $\Delta$ <i>hha</i>
D60A-F	AAA-TCA-GAA-AAG-CTT-TCG-TGT-TTA -T	Fwd	pT3-400EcpR- D60A
D60A-R	ATA-AAC-ACG-AAA-GCT-TTT-CTG-ATT -T	Rev	pT3-400EcpR- D60A
G159A-F	TGA-CGG-CTC-AGG-CAA-TGC-TGC-CTA -A	Fwd	pT3-400EcpR- G159A
G159A-R	TTA-GGC-AGC-ATT-GCC-TGA-GCC-GTC -A	Rev	pT3-400EcpR- G159A
T175A-F	TGT-AGT-GTG-AAG-GCA-GTG-TAT-ACC -C	Fwd	pT3-400EcpR- T175A
T175A-R	GGG-TAT-ACA-CTG-CCT-TCA-CAC-TAC -A	Rev	pT3-400EcpR- T175A
V176A-F	GTG-TGA-AGA-CAG-CGT-ATA-CCC-ATC -G	Fwd	pT3-400EcpR- V176A
V176A-R	CGA-TGG-GTA-TAC-GCT-GTC-TTC-ACA -C	Rev	pT3-400EcpR- V176A
K186A-F	AAT-GCA-GAG-GCC-GCG-CTG-TAC-TCA -AA	Fwd	pT3-400EcpR- K186A
K186A-R	TTT-GAG-TAC-AGC-GCG-GCC-TCT-GCA -TT	Rev	pT3-400EcpR- K186A
ecpR-Nco- 1F	GGT-TTG-GAC-CAT-GGT-GAC-ATG-GCA -AAA-TG	Contiene un sitio NcoI, Fwd	Clonar a <i>ecpR</i> en el pBAD/MycHis
ecpR-H3-R	CTT-GCC-TGG-AAG-CTT-CTG-AAC-CAA -C	Contiene un sitio HindIII, Rev	Clonar a <i>ecpR</i> en el pBAD/MycHis
G652	GAA-AAG-CCA-TGG-AAA-AAA-AGG-TTC	Sitio NcoI, Fwd	Clonar a <i>ecpA</i>
G653	CAG-AGA-AGC-TTA-CTG-GTC-CAG- GTA-GCG	Sitio HindIII, Rev	Clonar a <i>ecpA</i> -MH
G654	GGG-GTA-CCC-AAG-CTT-GTA-CAT-CAG	Sitio HindIII, Rev	Clonar a <i>ecpA</i>
G655	TAA-TCT-CTC-CCA-TGG-ACC-AGC-AGG	Sitio NcoI, Fwd	Clonar a <i>ecpB</i>

G656	CTG-CAC-AGC-AAG-CTT-TTT-CAC-GGG	Sitio HindIII, Rev	Clonar a <i>ecpB</i> -MH
G657	CAT-TGA-AGC-TTT-CCA-TCT-GCA-CAG-C	Sitio HindIII, Rev	Clonar a <i>ecpB</i>
G658	GGA-TAA-CGA-ACA-TGT-CTT-TAC-GAC	Sitio Pcil, Fwd	Clonar a <i>ecpC</i> y <i>ecpCDE</i>
G659	ATC-AGT-AAG-CTT-ACT-CTC-ATT-CTC	Sitio HindIII, Rev	Clonar a <i>ecpC</i> -MH
G660	GAT-TAG-CGC-AAA-GCT-TAT-CAT-CGC	Sitio HindIII, Rev	Clonar a <i>ecpC</i> y <i>ecpABC</i>
G661	AGG-AGA-AGA-CCA-TGG-GAG-TTA-ACC	Sitio NcoI, Fwd	Clonar a <i>ecpD</i> y <i>ecpDE</i>
G662	GCA-GGA-AGC-TTG-TTA-ATG-TTA-CGC-CAC	Sitio HindIII, Rev	Clonar a <i>ecpD</i> -MH
G663	GAC-CAC-TGT-AAG-CTT-GGC-CTT-AGT	Sitio HindIII, Rev	Clonar a <i>ecpD</i>
G664	GCG-TAC-GGT-CCA-TGG-TAA-CGG-CTG	Sitio NcoI, Fwd	Clonar a <i>ecpE</i>
G665	GGA-TAA-AAG-CTT-GTC-CGC-CGA-AGG-G	Sitio HindIII, Rev	Clonar a <i>ecpE</i> -MH
G666	TGA-GGT-GGA-AAG-CTT-CCC-TCG-TCC	Sitio HindIII, Rev	Clonar a <i>ecpE</i> , <i>ecpCDE</i> y <i>ecpDE</i>
<i>ecpA</i> -Pcil-Fwd	GAA-AAG-ACA-TGT-AAA-AAA-AGG-TTC-TGG	Sitio Pcil, Fwd	Clonar a <i>ecpABC</i>
<i>ecpA</i> -P1	AGC-GGC-GAC-GTT-AGC-GTA-CAG-TTC-GAC-GCT-ACC-TGG-ACC-AGT-GAC-TAC-AAA-GAC-CAT-GAC-GG	Fwd	Etiquetar a <i>ecpA</i>
<i>ecpA</i> -P2	GGA-ATA-AAG-CAG-GGG-GGT-ACC-CCT-GCT-GGT-ACA-TCA-GAG-AGA-CAT-ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Etiquetar a <i>ecpA</i>
<i>ecpB</i> -P1	CGG-GTT-GCA-CTT-TGG-CAG-GGT-GAT-AAG-TTC-ATT-CCC-GTG-AAA-GAC-TAC-AAA-GAC-CAT-GAC-GG	Fwd	Etiquetar a <i>ecpB</i>
<i>ecpB</i> -P2	AAC-CGT-CGT-AAA-GGC-ATT-GTC-GTT-ATC-CAT-CTG-CAC-AGC-TAT-CAT-ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Etiquetar a <i>ecpB</i>
<i>ecpC</i> -P1	TCG-TGG-GCG-GCG-GTG-ACG-CAG-ACA-GGA-GAA-GAG-AAT-GAG-AGT-GAC-TAC-AAA-GAC-CAT-GAC-GG	Fwd	Etiquetar a <i>ecpC</i>
<i>ecpC</i> -P2	GAT-TAG-CGC-AAA-GAT-TAT-CAT-CGC-TAT-CAG-TAG-GTT-AAC-TCT-CAT-ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Etiquetar y mutar a <i>ecpC</i>
<i>ecpD</i> -P1	TCA-GGA-GAG-ATT-CAT-GTT-CAG-GCG-ACG-TGG-CGT-AAC-ATT-AAC-GAC-TAC-AAA-GAC-CAT-GAC-GG	Fwd	Etiquetar a <i>ecpD</i>
<i>ecpD</i> -P2	GTC-AAA-GGT-GCC-GCC-AGC-ATA-CAG-ACC-ACT-GTC-AGC-AGG-GCC-CAT-ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Etiquetar a <i>ecpD</i>
<i>ecpE</i> -P1	AAG-ATT-AGC-GAT-TCC-TGT-CCG-GCT-AAG-CCC-CCT-TCG-GCG-GAC-GAC-TAC-AAA-GAC-CAT-GAC-GG	Fwd	Etiquetar a <i>ecpE</i>
<i>ecpE</i> -P2	AGT-CTC-TGA-GGT-GGA-ATT-CTT-CCC-TCG-TCC-GAT-GGA-TAA-GTC-CAT-ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Etiquetar a <i>ecpE</i>

ecpB-H1	GAC-CAG-TTA-ATC-TCT-CTG-ATG-TAC -CAG-CAG-GGG-TAC-CCC-CCT-TGT- AGG-CTG-GAG-CTG-CTT-CG	Fwd	Mutar a <i>ecpB</i>
ecpB-H2	ATC-CAT-CTG-CAC-AGC-TAT-CTA-TTT -CAC-GGG-AAT-GAA-CTT-ATC-CAT- ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Mutar a <i>ecpB</i>
ecpC-H1	TGC-AGA-TGG-ATA-ACG-ACA-ATG-CCT -TTA-CGA-CGG-TTC-TCC-CCA-TGT- AGG-CTG-GAG-CTG-CTT-CG	Fwd	Mutar a <i>ecpC</i>
ecpD-H1	CGC-AGA-CAG-GAG-AAG-AGA-ATG-AGA -GTT-AAC-CTA-CTG-ATA-GCG-TGT- AGG-CTG-GAG-CTG-CTT-CG	Fwd	Mutar a <i>ecpD</i>
ecpD-H2	GAA-TCT-CTC-CTG-AAG-CGC-TGA-CTT -CGC-CAA-ACC-AGC-CGT-TAT-CAT- ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Mutar a <i>ecpD</i>
ecpE-H1	CGA-CGT-GGC-GTA-ACA-TTA-ACT-AAG -GCC-CTG-CTG-ACA-GTG-GTC-TGT- AGG-CTG-GAG-CTG-CTT-CG	Fwd	Mutar a <i>ecpE</i>
ecpE-H2	TCG-TCC-GAT-GGA-TAA-GTC-TTA-GTC -CGC-CGA-AGG-GGG-CTT-AGC-CAT- ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Mutar a <i>ecpE</i>
ecpB-F	AAA-CTA-CCA-CTT-TCA-GTA-CGC	Fwd	Checar a <i>ecpB-FLAG</i>
ecpB-F2	TAC-CGT-GAT-GAT-CGA-TAC-CG	Fwd	Checar a $\Delta$ <i>ecpB</i>
ecpB-R	GGC-GAG-ATG-AAT-ATA-GAG-CG	Rev	Checar a <i>ecpB-FLAG</i> y $\Delta$ <i>ecpB</i>
ecpC-F	ACG-GAT-TAA-CAA-CCA-TAT-CGG	Fwd	Checar a <i>ecpC-FLAG</i>
ecpC-R	GTA-ACC-GTT-ATC-AAT-GTA-GCC	Rev	Checar a <i>ecpC-FLAG</i>
ecpD-R	AAA-AGT-AGT-TCA-CCA-TCC-ACC	Rev	Checar a <i>ecpD-FLAG</i>
ecpE-F	AGC-TAC-AAA-AAC-CTA-CGA-TG	Fwd	Checar a $\Delta$ <i>ecpE</i>
ecpE-F2	GGT-TTA-AGC-TAC-TGA-TTA-AAC-C	Fwd	Checar a <i>ecpE-FLAG</i>
ecpE-R	GTC-CTA-ATT-AGT-GAA-GAA-ACC	Rev	Checar a $\Delta$ <i>ecpE</i>
Cr-ecpA-F	CAC-AAC-CAA-ACA-AAC-ATG-CTG	Fwd	Checar $\Delta$ <i>ecpA</i>
Cr-ecpA-H1	TCT-CAG-GAG-AAG-ACA-AAA-GTG-AAA -AAA-ATA-TTA-CTG-GCC-GCA-TGT- AGG-CTG-GAG-CTG-CTT-CG	Fwd	Mutar a <i>ecpA</i>
Cr-ecpA-H2	GAA-TCA-TTA-TCA-TCA-CTG-TTA-CGG -CGT-TGC-TGC-CGG-CGT-GGT-CAT- ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Mutar a <i>ecpA</i>
Cr-ecpA-R	GAA-TCG-GTC-GTA-TTG-GTG-AC	Rev	Checar mutante y etiquetada de <i>ecpA</i>
Cr-ecpR-F	AAC-CTT-GTC-GTG-CTG-TTG-AC	Fwd	Checar $\Delta$ <i>ecpR</i>
Cr-ecpR-H1	CGG-CAA-AGG-GGG-CGG-CTC-ATG-AAT -TTT-ACA-TTA-CCG-ATG-AAT-TGT- AGG-CTG-GAG-CTG-CTT-CG	Fwd	Mutar a <i>ecpR</i>



Cr-ecpR-H2	AGG-TCA-GAA-AAC-GTT-GCG-TCA-GCA -TCG-GCT-ATG-GAA-GTG-CTC-CAT- ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Mutar a <i>ecpR</i>
Cr-ecpR-R	TGT-CAA-CAG-CAA-TGG-TTA-GTC	Rev	Checar mutante y etiquetada de <i>ecpR</i>
Cr-ecpA-P1	GTT-CAG-TTT-ACC-GCT-ACA-TGG-ACC -ACG-CCG-GCA-GCA-ACG-CCG-GAC- TAC-AAA-GAC-CAT-GAC-GG	Fwd	Etiquetar a <i>ecpA</i>
Cr-ecpA-P2	GAA-AAT-TCG-GGA-GAA-ATG-CCT-CCC -GAA-TCA-TTA-TCA-TCA-CGT-CAT- ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Etiquetar a <i>ecpA</i>
Cr-ecpA-F2	AAC-AAA-AAC-CTC-CGG-TCT-GG	Fwd	Checar etiquetada de <i>ecpA</i>
Cr-ecpR-P1	CGG-CTT-GAA-AAA-CTC-ATT-ATT-GAG -CAC-TTC-CAT-AGC-CGA-TGC-GAC- TAC-AAA-GAC-CAT-GAC-GG	Fwd	Etiquetar a <i>ecpR</i>
Cr-ecpR-P2	CCC-GCT-TTC-GAT-GTC-GAT-GCA-AAC -AGG-TCA-GAA-AAC-GTT-GCG-CAT- ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Etiquetar a <i>ecpR</i>
Cr-ecpR-F2	TTA-ACG-GGA-AAA-GCA-TTA-TGC	Fwd	Checar etiquetada de <i>ecpR</i>
ecpA-582F	GTT-TTC-AGG-GAT-c <sub>cc</sub> C-TCA-TCT-CAC	Sitio BamHI. Fwd	Fusión <i>ecpA</i> -582
ecpA-H3R	GTA-ATA-ACa-AGC-TtG-CTT-CTG-GTG	Sitio HindIII. Rev	Fusión <i>ecpA</i> -582
ecpR-H3R	CAG-TGA-ATA-AAG-ctT-TAT-CAC-CCG	Sitio HindIII. Rev	Fusión <i>ecpR</i> -567
ecpR-567F	TGT-AGG-TGG-AtC-cGT-TGG-TGA-TTC	Sitio BamHI. Fwd	Fusión <i>ecpR</i> -567
<i>fimK</i> -F	GTG-CAG-TCG-ATT-ATC-GGG-GTG	Fwd	Checar $\Delta$ <i>fimK</i>
<i>fimK</i> -H1	TTG-CCC-GAC-GAC-CCT-CTC-TGG-CTG -CTG-GAA-ACC-CTG-CAA-CAG-TGT- AGG-CTG-GAG-CTG-CTT-CG	Fwd	Mutar a <i>fimK</i>
<i>fimK</i> -H2	CTA-TCC-GTC-GGT-TTT-AAC-TCA-TTT -ATT-GCT-GGC-CTC-TGC-CTC-CAT- ATG-AAT-ATC-CTC-CTT-AG	Rev	Mutar a <i>fimK</i>
<i>fimK</i> -R	TGC-TGG-CGT-GTT-CTT-TTG-TCT-G	Rev	Checar $\Delta$ <i>fimK</i>

Fwd- delantero

Rev- reverso

### 5.3 Construcción de cepas mutantes y etiquetadas

Las cepas de EPEC, EHEC, MC4100 y *C. rodentium* mutantes (Tabla 4) se construyeron por el método de mutagénesis en un solo paso por productos de PCR desarrollado por Datsenko y Wanner (2000), mientras que las cepas etiquetadas se

---

---

hicieron por el método de etiquetado con epítopes de genes cromosomales de Uzzau y colaboradores (2001) utilizando los oligonucleótidos listados en la Tabla 5. Brevemente, las cepas silvestres se transformaron con el plásmido pKD46. Por otro lado, se amplificó por PCR el casete de Km o Cm usando como molde los plásmidos pKD4 o pKD3, respectivamente, para las cepas mutantes y pSUB11 para las cepas etiquetadas. Los productos se concentraron mediante extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y resuspendidos en 10  $\mu$ l de agua. Ya con las cepas transformadas y los productos concentrados se prepararon electrocompetentes de las cepas y se transformaron con 3  $\mu$ l de cada producto de PCR. Las transformantes se recuperaron en 1 ml de medio SOC (contiene 2 g de bacto triptona, 0.5 g de extracto de levadura, 0.2 ml NaCl 5 M, 0.25 ml de KCl 1 M, 1 ml de MgCl 1 M, 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 1 M y 0.36 g de glucosa aforado a 100 ml) a 30°C toda la noche y, posteriormente, se plaquearon los cultivos en cajas con medio LB agar suplementado con Km o Cm y se incubaron toda la noche a 30°C. Las colonias obtenidas se replicaron en LB agar suplementado con Km o Cm y Ap e incubaron a 42°C toda la noche para seleccionar aquellas que tuvieran la mutación o la etiqueta y que hubieran perdido el pKD46. Las candidatas se analizaron por PCR usando oligonucleótidos que reconocen secuencias aledañas a los sitios de inserción (Tabla 5).

#### **5.4 Construcción de fusiones transcripcionales**

Para la construcción de las fusiones transcripcionales (Tabla 4) se utilizaron los oligonucleótidos enlistados en la Tabla 5, con los cuales se realizaron las reacciones de PCR utilizando como molde DNA genómico de las cepas EPEC E2348/69 Sm<sup>r</sup>, EHEC EDL933 o *C. rodentium* DBS100 y la enzima *Taq* polimerasa (Altaenzymes). Una vez obtenidos los productos de PCR, se limpiaron con el estuche comercial "PCR cleanup" (Axygen) y se eluyeron en 25  $\mu$ l de agua. Posteriormente se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y HindIII (Invitrogen) incubando a 37°C toda la noche. En seguida se realizaron las reacciones de ligación con los insertos y el vector pKK232-8 digerido con las mismas enzimas, en una relación 3:1, respectivamente, utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Promega). Las reacciones se incubaron a 4°C toda la noche y posteriormente se introdujeron en las cepas de *E. coli* K12 MC4100 o DH5 $\alpha$  por electroporación. Las cepas transformadas se recuperaron en medio SOC a 37°C por 3 hr y se cultivaron en agar LB con Ap para seleccionar aquellas que tuvieran el plásmido. Posteriormente, se eligieron

---

---

varias colonias y se checó que tuvieran el plásmido con el inserto correspondiente mediante PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos pKK-BHI-F y pKK-H3-R. Una vez corroborados los plásmidos, se purificaron con el estuche comercial High Pure Plasmid Kit (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se mandaron secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología-UNAM. Para los ensayos se transformó a las cepas a analizar con 4  $\mu$ l de cada plásmido.

Las fusiones ecpR-4m1, ecpR-4m2, ecpR-4m3, ecpR-4m4, ecpR-4IRm1 y ecpR-4IRm2 se construyeron por PCR sobrelapado. Primero se amplificaron dos fragmentos por separado utilizando los oligonucleótidos listados en la Tabla 5. Una vez obtenidos ambos productos, se utilizaron como molde para el PCR sobrelapado con los oligonucleótidos pKK-BHI-F y pKK-H3-R. El producto obtenido se limpió con el estuche comercial "PCR cleanup" (Axygen) y eluido en 25  $\mu$ l de agua. Las digestiones y ligaciones se hicieron como se mencionó anteriormente.

## **5.5 Ensayo de actividad de CAT**

La determinación de la actividad de las fusiones transcripcionales al gen *cat* se realizó como se describió anteriormente (Puente et al, 1996). Brevemente, las cepas transformadas con las fusiones se cultivaron en 5 ml de LB adicionado con Ap en agitación a 37°C toda la noche. Al día siguiente se tomaron 100  $\mu$ l para inocular 5 ml de DMEM suplementado con Ap y se incubaron por 6 hr a 37°C en agitación o toda la noche a 26°C ó 30°C en estático. Se tomaron muestras de 1.5 ml cada cultivo, se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 min a 4°C, las pastillas se lavaron con 800  $\mu$ l de regulador TDTT (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, DTT 3  $\mu$ M) y posteriormente se resuspendieron en 300  $\mu$ l de TDTT. Para obtener los extractos crudos las muestras se sonicaron con pulsos de 1 min y se centrifugaron a 12,000 rpm por 20 min a 4°C.

La concentración de proteínas se determinó con el estuche comercial BCA (Pierce) y la actividad de CAT se determinó mediante una cinética de actividad enzimática con acetil-CoA, cloranfenicol y 5,5'-ditio-bis 2-ácido nitrobenzónico (DTNB, Research Organics) en un lector de microplacas computarizado tipo Ceres (Biotek) y el programa KC3. La actividad

---

---

específica de CAT se determinó dividiendo la actividad obtenida entre la concentración de proteína de cada extracto.

## 5.6 Construcción de plásmidos

Para la construcción de los plásmidos pT3-EcpR-400 y pK3-EcpR-400 (Tabla 4) se utilizaron los oligonucleótidos ecpR-400F y Km-SstI-R (Tabla 5), con los cuales se realizaron las reacciones de PCR utilizando como molde DNA genómico de la cepa EPEC E2348/69 EcpR-3xFLAG y la enzima Taq polimerasa (Altaenzymes). Una vez obtenidos los productos de PCR, se limpiaron con el estuche comercial “PCR cleanup” (Axygen) y se eluyeron en 25  $\mu$ l de agua. Posteriormente se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y SstI (Invitrogen) incubando a 37°C toda la noche. En seguida se realizaron las reacciones de ligación con los insertos y los vectores pMPPM-T3 y pMPPM-K3 digeridos con las mismas enzimas, en una relación 3:1, respectivamente, utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Promega). Para la construcción de los plásmidos pT3-EcpR, pT3-EcpR-D60A, pT3-EcpR-G159A, pT3-EcpR-N170K-T175A, pT3-EcpR-T175A, pT3-EcpR-V176A, pT3-EcpR-V176A-Q196L y pT3-EcpR-K186A (Tabla 4) se digirió 50  $\mu$ l de los plásmidos pT3-EcpR-400, pT3-400EcpR-D60A, pT3-400EcpR-G159A, pT3-400EcpR-N170K-T175A, pT3-400EcpR-T175A, pT3-400EcpR-V176A, pT3-400EcpR-V176A-Q196L y pT3-400EcpR-K186A (Tabla 4) con las enzimas EcoRI y SstI a 37°C toda la noche. Posteriormente se realizó la reacción de ligación con 6  $\mu$ l de los plásmidos digeridos y la enzima T4 DNA ligasa (Promega). Las reacciones fueron incubadas a 4°C toda la noche y posteriormente introducidas en la cepa de *E. coli* K12 DH5 $\alpha$  por electroporación. Las cepas transformadas fueron recuperadas en medio SOC a 37°C por 3 hr y se cultivaron en agar LB con Tc o Km, respectivamente, para seleccionar aquellas que tuvieran los plásmidos. Posteriormente, se eligieron varias colonias y se comprobó que tuvieran el respectivo plásmido con el inserto mediante PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos PMPM-Fwd y PMPM-Rev.

Para la construcción de los plásmidos pecpA, pecpA-MH, pecpB, pecpB-MH, pecpC, pecpC-MH, pecpD, pecpD-MH, pecpE, pecpE-MH, pT6-ABC, pT6-CDE y pT6-DE (Tabla 4) se utilizaron los oligonucleótidos listados en la Tabla 5, con los cuales se realizaron las reacciones de PCR utilizando como molde DNA genómico de la cepa EPEC E2348/69

---

---

Sm<sup>f</sup> y la enzima *Taq* polimerasa (Altaenzymes). Una vez obtenidos los productos de PCR, se limpiaron y se eluyeron en 25 µl de agua. Posteriormente se digirieron con las enzimas de restricción NcoI o PciI y HindIII (Invitrogen) incubando a 37°C toda la noche. En seguida se realizaron las reacciones de ligación con los insertos y los vectores pMPM-T6 y pBAD/MyHis A digeridos con NcoI y HindIII, en una relación 3:1, respectivamente, utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Promega). Las reacciones se incubaron a 4°C toda la noche y posteriormente se introdujeron en la cepa de *E. coli* K12 DH5α por electroporación. Las cepas transformadas se recuperaron en medio SOC a 37°C por 3 hr y se cultivaron en agar LB con Tc o Ap, respectivamente, para seleccionar aquellas que tuvieran el plásmido. Posteriormente, se eligieron varias colonias y se checó que tuvieran el plásmido con el inserto correspondiente mediante PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos T6-UIA y T6-D2B, y BAD-Fwd y BAD-Rev, respectivamente.

Una vez corroborados los plásmidos, se purificaron con el estuche comercial High Pure Plasmid Kit (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se mandaron secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología-UNAM.

### 5.7 Mutagénesis sitio-dirigida

Los plásmidos pT3-400EcpR-D60A, pT3-400EcpR-G159A, pT3-400EcpR-N170K-T175A, pT3-400EcpR-T175A, pT3-400EcpR-V176A, pT3-400EcpR-V176A-Q196L y pT3-400EcpR-K186A (Tabla 4), se construyeron por PCR inverso utilizando oligonucleótidos complementarios (Tabla 5) diluidos a 100 nM y como molde DNA del plásmido pT3-EcpR-400. Las condiciones que se utilizaron fueron las siguientes:

94° C - 5 min	1 ciclo
94° C - 30 seg	} 18 ciclos
60° C - 1 min	
70° C - 12 min	

Cuando se obtuvieron los productos de PCR se limpiaron con el estuche comercial “PCR Cleanup” (Axigen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se

---

---

digirieron con 1.5  $\mu$ l de la enzima DpnI (Invitrogen), incubando a 37°C toda la noche. Al día siguiente se electroporaron 5  $\mu$ l de cada digestión en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se recuperaron por 3 hr a 37°C en medio SOC. Se cultivaron en agar LB suplementado con Tc para seleccionar a las colonias que tuvieran el plásmido. Se eligieron 4 colonias al azar, se purificaron los plásmidos con el estuche comercial High Pure Plasmid Kit (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se secuenciaron para comprobar que estuvieran bien.

### **5.8 Citometría de flujo**

La detección de la producción de ECP se realizó mediante citometría de flujo como se describió anteriormente (Humphries et al, 2003). Brevemente, se incubaron 10<sup>6</sup> bacterias crecidas toda la noche en medio DME con formalina al 2% por 10 min. Se removió la formalina por centrifugación y lavados repetidos con PBS. Posteriormente, las bacterias fueron incubadas con anticuerpos anti-ECP toda la noche a 4°C, lavadas e incubadas con anticuerpos anti-conejo acoplados a Alexa Fluor 488 por 1 hr a 4°C. La emisión fluorescente del Alexa Fluor se colectó a través de un filtro de banda de 30 nm de paso centrado a 530 nm en el cual se midieron 50,000. También se marcó a la bacterias con yoduro de propidio y se detectaron a través de un filtro de banda de 42 nm de paso centrado a 585 nm. Las muestras se analizaron en un FACScan Becton Dickinson.

### **5.9 Purificación de RNA**

Las bacterias se cultivaron como se mencionó anteriormente. Se tomó 1 ml de los cultivos de toda la noche para inocular 50 ml de DMEM y se incubaron en agitación a 37°C hasta una DO<sub>600</sub> de 1.0. De los cultivos se tomaron 20 ml de muestra, se centrifugaron a 8,000 rpm a 4°C y las pastillas se guardaron a -20°C. Posteriormente, se extrajo el RNA total con el estuche comercial RNeasy (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración y la calidad de RNA se determinaron midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm ( $A_{260}$  y  $A_{280}$ ), y corriendo 4  $\mu$ l de muestra en un

---

---

gel de agarosa al 1%. Para la cuantificación se utilizó la fórmula:  $[\text{ng}/\mu\text{l}] = A_{260} \times 40 \times$  factor de dilución.

### **5.10 Determinación del inicio de transcripción por “primer extension”**

Las reacciones de “primer extension” se hicieron como se describió anteriormente (Martinez-Laguna et al, 1999) con algunas modificaciones. Para la reacción se utilizó el oligonucleótido ecpR-Rev marcado con  $^{32}\text{P}$  y 10  $\mu\text{g}$  de RNA en NaCl 5 M, Tris H-Cl 1 M pH 8.0, agua DEPC calentando 3 min a 90°C y después enfriando lentamente hasta 50°C. Las reacciones de transcripción se hicieron a 37°C por hora y media con la enzima M-LV (Invitrogen) adicionando además DTT 100 mM y dNTP's 10mM, así como inhibidor de RNAsa (Invitrogen, 40 U/ $\mu\text{l}$ ). Los productos se purificaron y concentraron usando una columna Microcon-30 (Amicon, Millipore), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Al final, se adicionaron 4  $\mu\text{l}$  de regulador de formamida. Las muestras se desnaturalizaron calentándolas a 80°C por 3 min y se corrieron en un gel de poliacrilamida 8% / urea 7 M/ TBE. El gel se secó al vacío a 80°C y se expuso en una película fotográfica tipo X-Omat (Kodak). Para las reacciones de secuencia se utilizó el mismo oligonucleótido y las fusiones ecpRA de E2348/69 y EDL933 y se hicieron por el método de terminación por dideoxinucleótidos de Sanger (1977), utilizando el estuche de secuenciación Thermo Sequenase de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Amersham, Inc.).

### **5.11 “Western blot”**

Las bacterias se cultivaron en 5 ml de LB a 37°C en agitación todo el día. Se inoculó 5 ml de DMEM, suplementado con el antibiótico correspondiente, con 100  $\mu\text{l}$  de cada preinóculo y los tubos se incubaron toda la noche a 26°C ó 30°C en estático. Se colectaron muestras de 3 ml de cada cultivo, se centrifugaron y las pastillas se resuspendieron en 200  $\mu\text{l}$  de regulador salino de fosfatos 1x (PBS, contiene 80 g de NaCl, 6.1 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g de KCl en un litro, pH7.4). Posteriormente se sonicaron con 3 pulsos de 1 min, se les añadió 60  $\mu\text{l}$  de “sample buffer” 4x (contiene 5 ml de glicerol 100%, 2 ml de SDS 20%, 1 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol, 2.5 ml de Tris-HCl pH6.8 y 0.2 g de azul de bromofenol) y se hirvieron por 5 min. Se cargaron 30  $\mu\text{l}$  de cada muestra

---

---

en geles de poliacrilamida al 12% (acrilamida 30%, bisacrilamida 0.8%) y después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  de poro (Amersham) en una cámara de transferencia semi-seca (BioRad) por 43 min a 19V. Al término, las membranas se bloquearon con leche descremada (Svelty) en regulador PBS-T (PBS + Tween 20) por al menos 90 min en agitación. Después, se incubaron con los anticuerpos primarios a la dilución recomendada ( $\alpha$ -DnaK 1:20,000,  $\alpha$ -ECP 1:15,000,  $\alpha$ -FLAG monoclonal 1:5,000) por 1 hr. Posteriormente se lavaron 3 veces de 10 min con PBS-T, se añadieron los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa en una dilución 1:10,000 y se incubaron por 1 hr. Por último, las membranas se volvieron a lavar y se revelaron con el estuche comercial de quimioluminiscencia y películas fotográficas tipo X-Omat (Kodak).

### 5.12 “Footprinting *in vivo*”

El ensayo de protección a dimetil sulfato (DMS) de la región reguladora de *ecp* se realizó *in vivo* usando el sistema de dos plásmidos compatibles descrito por Morett y colaboradores (1991) con las siguientes modificaciones: 10 ml de cultivos de EHEC EDL933 con los plásmidos *pecpR-4* y el vector *pMPM-T3* o sus derivados *pT3-EcpR* o *pT3-K186A* (los cuales expresan a *EcpR* silvestre y mutante, respectivamente) se colectaron después de 6 hr de crecimiento en DMEM a 37°C en agitación. Después se añadió DMS al 2% en una concentración final de 0.1% a cada cultivo y se agitaron por 1 min. Los cultivos se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 min a 4°C y las pastillas lavadas dos veces con solución salina de fosfatos (150 mM de NaCl, 40 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 22 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2). Los plásmidos metilados se purificaron usando el estuche comercial High Pure Plasmid Isolation (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se cortaron en las posiciones metiladas (principalmente guaninas y algunas adeninas) con piperidina 1M a 90°C por 30 min. Después el DNA se precipitó y se lavó con etanol al 70% y se disolvió en 100  $\mu\text{l}$  de agua. Las reacciones de “primer extension” se hicieron usando los oligonucleótidos *pKK-BHI-F* y *ecpR-3R* marcados con  $[\gamma^{32}\text{P}]$ -ATP, los cuales se mezclaron con 0.5 mg de DNA metilado en un volumen final de 30  $\mu\text{l}$  de buffer TM (10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM de Tris-HCl pH 8.0). El apareamiento se hizo hirviendo la mezcla por 3 min y colocando inmediatamente en hielo. La extensión se hizo con 1 U del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Roche Applied Science) por 10 min a 50°C usando 0.1 M de cada deóxido trifosfato. Los productos de la extensión se



---

---

precipitaron, se secaron, se resuspendieron en buffer de carga y se separaron por electroforesis en gel en geles de poliacrilamida al 7% con 8 M de urea. Los geles se secaron y se expusieron en películas fotográficas tipo X-Omat (Kodak) entre 3 y 5 días.

### **5.13 Purificación de la proteína H-NS-MH**

La proteína H-NS etiquetada con el epítotope Myc y 6 residuos de Histidina en el C-terminal (H-NS-MycHis) se purificó bajo condiciones desnaturalizantes por cromatografía de afinidad con la resina de Ni-ácido nitrilotriacético (QIAExpress, Qiagen) como se describió anteriormente (De la Cruz et al, 2007). Brevemente, se cultivó a la cepa BL21 conteniendo al plásmido pMDH-NS (Tabla 4) en 5 ml de medio LB con Ap incubando a 37°C en agitación toda la noche. Al día siguiente se inocularon 2 matraces con 100 ml de LB con Ap y 1 ml del preinóculo y se incubaron a 37°C en agitación hasta una DO<sub>600</sub> de 0.7. Posteriormente, se indujeron con L-(+)-arabinosa (Sigma-Aldrich) en una concentración final de 0.1% y se incubaron por 4 hr más. Después se empaquetaron las células centrifugando a 10,000 rpm por 5 min a 4°C. Se resuspendió la pastilla en 5 ml de buffer de unión (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 M urea, 2 M Tris-HCl pH 8.0, pH final 8.0) y se dividió en alícuotas de 750 µl, las cuales se sonicaron hasta clarificar, después se centrifugaron 20 min a 10,000 rpm a 4°C. Con una jeringa se recuperó el sobrenadante, el cual se filtró a través de una columna de agarosa con Ni-ácido nitrilotriacético. La columna se lavó con buffer de unión antes de pasar el filtrado y después con buffer de lavado (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 M urea, 2 M Tris-HCl pH 8.0, pH final 6.5). La proteína unida se eluyó con el siguiente buffer: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 M urea, 2 M Tris-HCl pH 8.0, pH final 4.5. Las fracciones colectadas se checaron por SDS-PAGE y las seleccionadas se dializaron gradualmente con un casete Slyde-A-Lyzer 10K (Pierce) a 4°C en buffer de diálisis [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20% glicerol, 0.5 M NaCl, 0.1% Tritón X-100 y concentraciones decrecientes de urea (4, 1 y 0.2 M)]. La diálisis final se hizo en buffer de almacenamiento (30 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20% glicerol, 240 mM NaCl, 0.1% Triton X-100 and 3 mM EDTA) y las alícuotas se almacenaron a -70°C. La concentración de la proteína fue determinada por el método de Bradford.

---

---

### 5.14 Ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSAs)

Para los ensayos de retardamiento en gel se amplificaron por PCR los fragmentos contenidos en las fusiones transcripcionales ecpR-4, ecpR-9, ecpR-10 y ecpR-14 utilizando los oligonucleótidos pKK-8-BHI-F y pKK-H3-R correspondientes al vector pKK232-8. Posteriormente los productos se purificaron y se concentraron usando una columna Microcon-100 (Amicon, Millipore) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los fragmentos concentrados se mezclaron con concentraciones crecientes de IHF (proporcionada por la Dra. Anca Segall, San Diego State University) y H-NS-MycHis (purificada y dializada) en regulador de unión (HEPES pH 7.8 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, KCl 45 mM, DTT 1 mM, NP<sub>4</sub>O 0.05%, BSA 0.1 mg/ml). Las reacciones se incubaron por 20 min a temperatura ambiente y, posteriormente, se cargaron las muestras en un gel de acrilamida nativa al 5% (acrilamida 30%, bisacrilamida 0.4%) y se corrieron a 97 V a temperatura ambiente en regulador de corrida TBE (0.5X). Al término, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador Alpha Imager.

El retardo de competencia se hizo con algunas modificaciones. El fragmento ecpR-4 se puso en contacto primeramente con la proteína H-NS-MycHis, a una concentración de 400 nM, para preformar el complejo. Las reacciones se incubaron por 20 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se agregó la proteína IHF en concentraciones crecientes y se incubó por otros 20 min. Posteriormente, se cargaron las muestras en un gel de acrilamida nativa al 5%, se corrió a 97 V a temperatura ambiente en regulador de corrida TBE (0.5X), se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador Alpha Imager.

### 5.15 “Pull down”

Las bacterias se inocularon en 5 ml de LB con antibiótico y se incubaron todo el día a 37°C en agitación. Después se inocularon 50 ml de medio DME adicionado con LB al 1%, antibiótico y arabinosa (0.05% para inducir a pecpE-MH y 0.2% para inducir a pecpA-MH) con 1 ml del preinóculo. Se incubó toda la noche a 26°C en estático. Se colectaron las pastillas centrifugando a 8,000 rpm a 4°C por 15 min. Las pastillas se lavaron con 20 ml de PBS 1X frío y se resuspendieron en 2 ml de PBS 1X frío. Se sonicaron por 10 min y se

---

---

centrifugaron por 10 min a 12,000 rpm a 4°C. Se recuperó el sobrenadante. Posteriormente se puso a interactuar 1 ml de cada extracto con 50 µl de resina de níquel equilibrada y se incubaron en el cuarto frío con agitación constante (por 24 hr para EcpA-MH y 4 hr para EcpE-MH). Después se centrifugaron los tubos a 6,000 rpm a 4°C por 10 min y se retiró el sobrenadante. La resina se lavó 5 veces con 500 µl de PBS-Imidazol frío (PBS 1X + 50 mM Imidazol) mezclando por inversión. Al final del 5° lavado se retiró el sobrenadante dejando 100 µl, se añadieron 33 µl de simple buffer 4x, se hirvieron las muestras por 5 min y se cargaron 30 µl de cada muestra en geles de poliacrilamida al 12%. Posteriormente se transfirieron las proteínas y se realizó un “western blot” con anticuerpos anti-FLAG y anti- Myc como se mencionó anteriormente.

#### **5.16 Microscopía inmuno-electrónica**

Las bacterias se inocularon en 5 ml de LB con antibiótico todo el día a 37°C en agitación. Después se inoculó 5 ml de medio DME adicionado con antibiótico con 100 µl del preinóculo y se incubó toda la noche a 26°C. Para preparar las suspensiones bacterianas se tomó 1 ml de cada cultivo, se centrifugaron por 3 min a 10,000 rpm, se decantaron y se resuspendieron las pastillas en el volumen restante. Se colocaron 10 µl de cada suspensión en rejillas de cobre y se incubaron por 2 min. Se secaron las rejillas con papel filtro y se añadieron 10 µl del anticuerpo primario anti-ECP diluido 1:10 en PBS-BSA 1% y se incubaron por 1 hr a temperatura ambiente. Se removió al anticuerpo primario con papel filtro y se lavaron las rejillas 3 veces con PBS 1X. Se añadieron 10 ml del anticuerpo secundario (anti-conejo acoplado a partículas de oro de 10 nm) diluido 1:10 en PBS-BSA 1% y se incubaron por 1 hr. Se removió el anticuerpo con papel filtro y las rejillas se lavaron 3 veces con PBS. Se añadieron 10 ml de PTA 1% (ácido fosfotúngstico) y se incubaron por 2 min. Se removió el PTA, se lavaron las rejillas con agua y se dejaron secar. Las muestras fueron analizadas en un microscopio electrónico Philips CM200FEG operando at 200 kV.

---

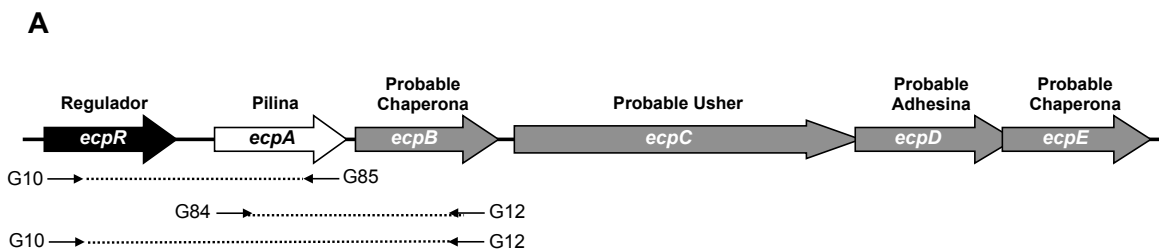
---

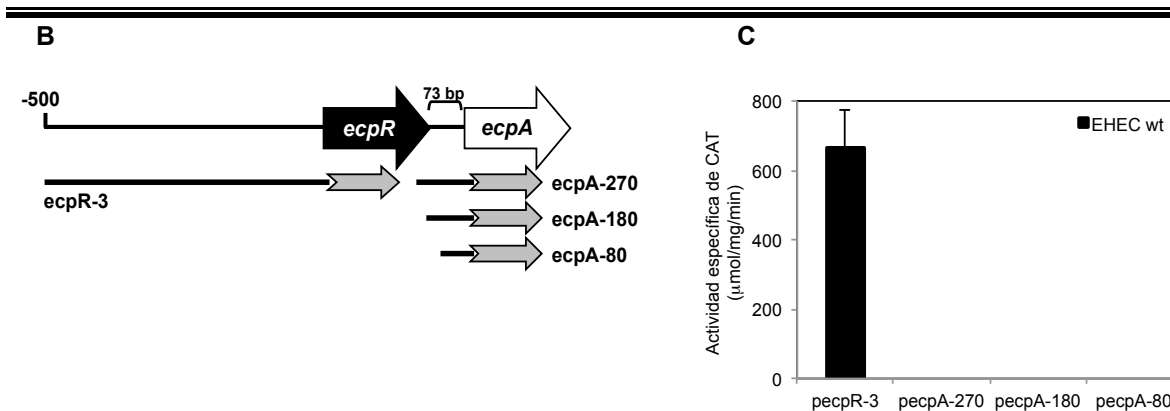
## 6. RESULTADOS

### CAPÍTULO I

#### 6.1 El cluster *ecp* se transcribe como operón

El primer gen del cluster *ecp* es *ecpR*, el cual codifica para una probable proteína reguladora y está separado del siguiente gen (*ecpA*) por 73 pb (Fig. 14A). Con el fin de determinar si *ecpR* se transcribe con el resto de los genes, se realizó un experimento de RT-PCR (datos no mostrados) utilizando oligonucleótidos específicos complementarios al inicio o final de *ecpR*, *ecpA* y *ecpB* (Fig. 14A). El resultado mostró productos de los tamaños correspondientes a las distintas combinaciones, indicando que al menos estos tres genes se transcriben como un operón y que la transcripción se inicia a partir de un promotor localizado corriente arriba de *ecpR*. Ya que *ecpA* codifica para la subunidad estructural de ECP, analizamos la posibilidad de que, además de expresarse a partir del promotor de *ecpR*, *ecpA* pudiera expresarse a partir de otro promotor localizado en la región intergénica. Con este propósito, se construyeron 3 fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* conteniendo diferentes porciones del extremo 3' de la región estructural de *ecpR* junto con la región intergénica entre *ecpR* y *ecpA* (Fig. 14B). Las fusiones, denominadas *ecpA*-270, *ecpA*-180 y *ecpA*-80, fueron inactivas cuando se probaron en la cepa de EHEC EDL933 silvestre, mientras que una fusión conteniendo la región corriente arriba de *ecpR* (*ecpR*-3), mostró una actividad de aproximadamente 600 unidades (Fig. 14C). Este resultado sugiere que el operón *ecp* se transcribe a partir de un promotor localizado corriente arriba de *ecpR* y que no existe un promotor en la región intergénica.

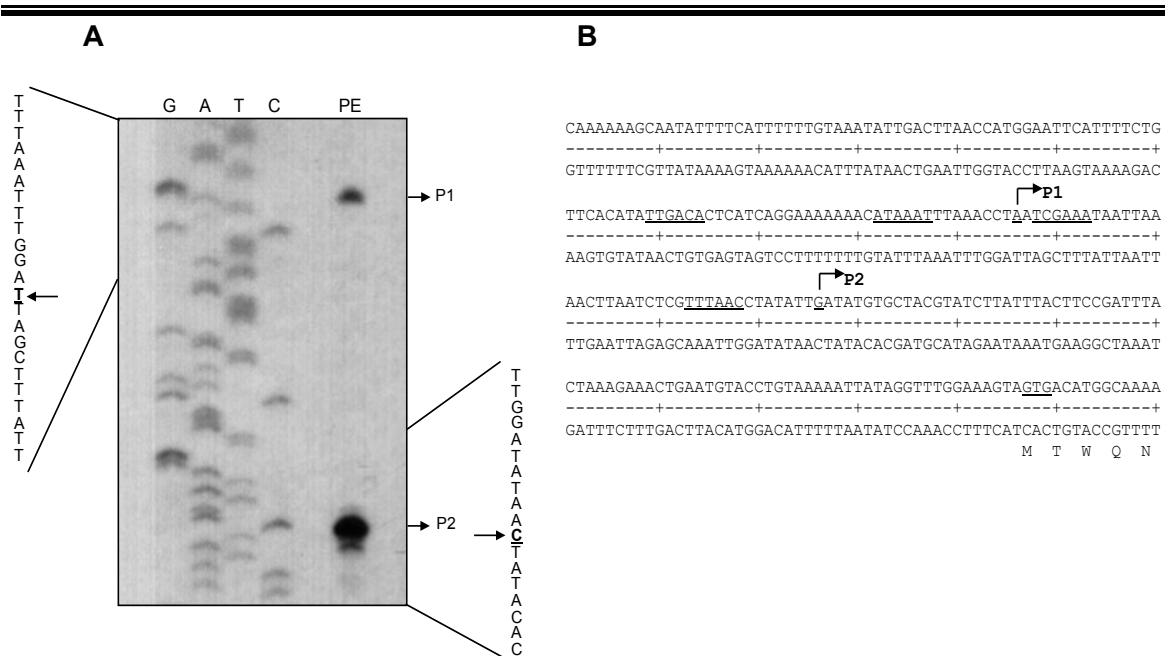




**Fig. 14.** El operón *ecp* se transcribe a partir de un promotor localizado corriente arriba de *ecpR*. **A)** Representación esquemática del operón *ecp* formado por los genes *ecpRABCDE*. La probable función de cada gen se indica arriba de las flechas. Las flechas de abajo representan los oligonucleótidos utilizados para el RT-PCR, las líneas discontinuas representan los productos obtenidos con cada par de oligonucleótidos. **B)** Esquema de las fusiones utilizadas en C). Las flechas grises representan el gen reportero *cat*. **C)** Ensayo de actividad de CAT con la cepa EDL933 silvestre transformada con las fusiones *ecpR-3*, *ecpA-270*, *ecpA-180* y *ecpA-80*, crecidas en medio DME a 37°C en agitación por 6 hr. La gráfica es resultado de tres experimentos diferentes con duplicado.

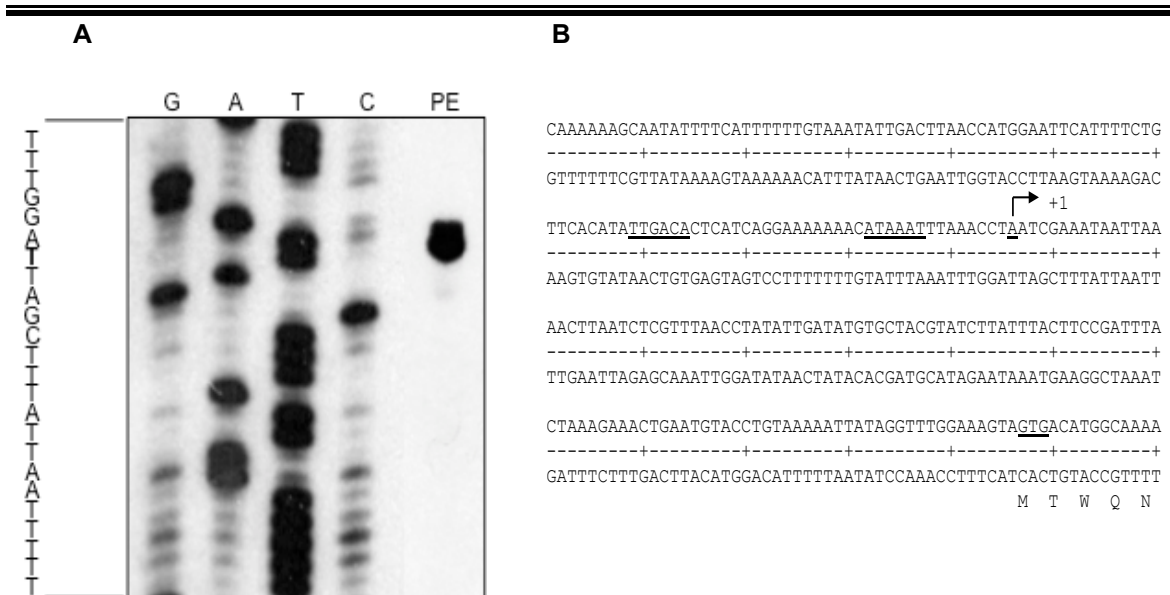
## 6.2 Identificación del sitio de inicio de la transcripción

Habiendo determinado que el operón *ecp* se transcribe a partir de un promotor localizado corriente arriba de *ecpR*, el siguiente paso fue identificar el sitio de inicio de la transcripción. Para esto, se realizó un experimento de “primer extension” con RNA de la cepa de EPEC E2348/69 silvestre transformada con el plásmido *pecpRA-P* que lleva la fusión *ecpRA* de EPEC (Tabla 4). El resultado de este experimento (Fig. 15A) reveló dos posibles sitios de inicio de la transcripción, los cuales corresponden a una A y una G localizadas a 120 (Promotor 1) y 81 (Promotor 2) pb, respectivamente, corriente arriba del codón de inicio. Con base en esto se localizaron las probables cajas -35 y -10 para cada promotor. Las cajas -35 (TTGACA) y -10 (ATAAAT) del promotor 1 (P1) contienen 6 y 3 (subrayadas), respectivamente, de 6 bases consenso para promotores dependientes de sigma 70 y están separadas por 17 pb; mientras que las cajas -35 (TCGAAA) y -10 (TTTAAC) del promotor 2 (P2) contienen 4 pb (subrayadas) y están separadas por 19 pb (Fig. 15B).



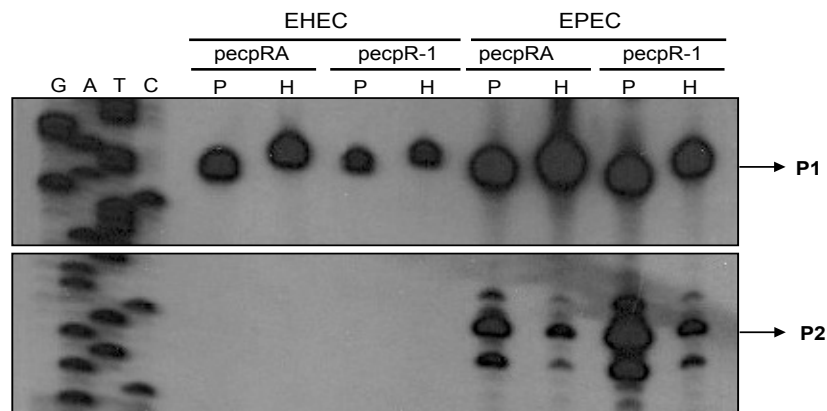
**Fig. 15.** Identificación del sitio de inicio de la transcripción de *ecpR* en EPEC. **A)** “Primer extension” con la cepa E2348/69 silvestre transformada con la fusión *ecpRA-P* crecida en medio DME a 37°C en agitación por 6 hr. **B)** Secuencia de la región reguladora de *ecpR*. Las flechas indican los sitios de inicio de la transcripción, las cajas -35 y -10, el sitio de inicio de la transcripción y el sitio de inicio de la traducción están subrayados.

Las secuencias del operón *ecp* de EPEC y EHEC son 99% idénticas; sin embargo, para determinar si el sitio de inicio de la transcripción es el mismo en ambas cepas, se realizó un experimento de “primer extension” con la cepa de EHEC EDL933 transformada con el plásmido *pecpRA-H* que lleva la fusión *ecpRA* de EHEC (Tabla 4). Como se puede observar en la Fig. 16A, el sitio de inicio de la transcripción corresponde a una A localizada a 121 pb corriente arriba del codón de inicio de *ecpR* (Fig. 16B). Este sitio de inicio es el mismo que el del P1 identificado en EPEC, aunque, interesantemente, en EHEC no se observa el presunto inicio del promotor P2. La única diferencia en esta región, entre las secuencias de ambas cepas, es una A menos localizada entre las cajas -10 y -35 del P2 en EPEC.



**Fig. 16.** Identificación del sitio de inicio de la transcripción de *ecpR* en EHEC. **A)** “Primer extension” con la cepa de EHEC EDL933 transformada con la fusión *ecpRA-H*. **B)** Secuencia de la región reguladora de *ecpR*. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. Las cajas -10 y -35, así como el codón de inicio están subrayados.

Con el fin de determinar si la falta de expresión del P2 en EHEC se debe a la incapacidad de la polimerasa de transcribir debido a la base extra entre las cajas -10 y -35, o a que la expresión de este promotor requiere de algún factor específico de EPEC, se realizó un experimento de “primer extension” con RNA total de las cepas silvestres de EPEC E2348/69 y EHEC EDL933 transformadas con los plásmidos *pecpR-1P*, *pecpR1H*, *pecpRA-P* y *pecpRA-H* que llevan las fusiones *ecpR-1* y *ecpRA* (Tabla 4). Como se puede observar en la Fig.17, en EPEC se detectan los dos sitios de inicio de la transcripción en las fusiones tanto de EPEC como de EHEC, mientras que en EHEC sólo se detecta un sitio, aun en las fusiones de EPEC. Este resultado sugiere que la falta de expresión del P2 en EHEC no se debe a la base extra que se encuentra entre las cajas -10 y -35, sino más bien, a que este promotor depende de un regulador que se encuentra en EPEC pero no en EHEC. Debido a que el único inicio de transcripción común para ambas cepas es el correspondiente al promotor P1 y a que no hemos descartado la posibilidad de que la banda derivada del “primer extension” correspondiente a P2 sea un producto de degradación que sólo se genera en EPEC, en adelante se considerará únicamente a P1 y las coordenadas de la región reguladora serán definidas en torno a este inicio de transcripción.



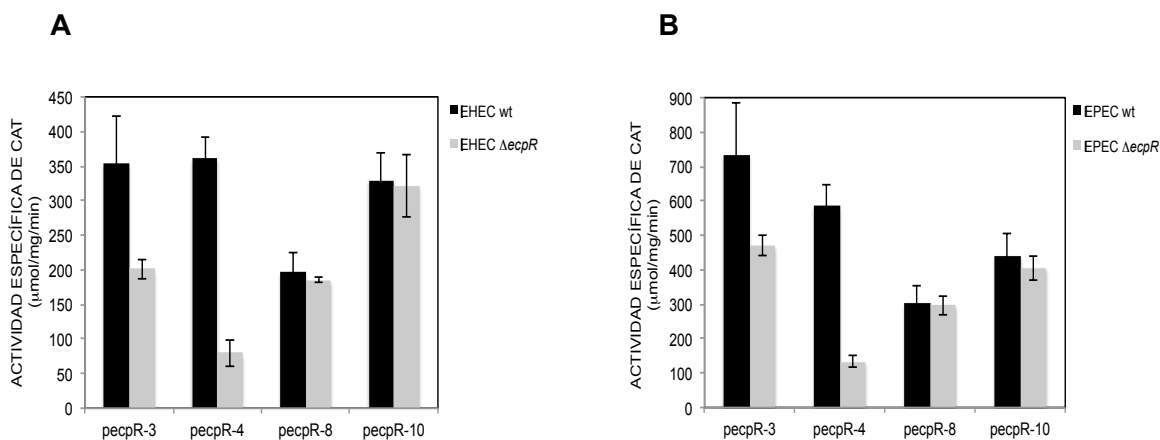
**Fig. 17.** El P2 sólo se expresa en EPEC. “Primer extension” con las cepas EPEC E2348/69 y EHEC EDL933 transformadas con las fusiones *ecpRA*-P, *ecpRA*-H, *ecpR*-1P y *ecpR*-1H crecidas en medio DME a 37°C en agitación por 6 hr.

### 6.3 La expresión de *ecp* es similar en EPEC y EHEC

Con el fin de identificar elementos reguladores involucrados en la regulación transcripcional del operón *ecp*, se construyeron las fusiones transcripcionales *ecpR*-1, *ecpR*-3, *ecpR*-4, *ecpR*-5, *ecpR*-6, *ecpR*-8, *ecpR*-9, *ecpR*-10, *ecpR*-11, *ecpR*-12, *ecpR*-13 y *ecpR*-14. Éstas abarcan diferentes porciones de la región 5' reguladora con un extremo 3' común correspondiente a la posición +198 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (Tabla 4 y Fig. 23C). Antes de comenzar con un análisis detallado de la región reguladora, decidimos determinar primero si la expresión de las fusiones es similar en EPEC y EHEC. Para esto, se introdujeron 4 fusiones representativas en sus respectivos fondos genéticos y se analizó su actividad por ensayos de actividad de CAT. Como se puede observar en la Fig. 18A (barras negras), la actividad de las fusiones *ecpR*-3 (-379 a +198) y *ecpR*-4 (-288 a +198) en la cepa silvestre de EHEC es de aproximadamente 350 unidades, mientras que la actividad de la fusión *ecpR*-8 (-188 a +198) es de 196 unidades, lo que implica una disminución de aproximadamente 48% con respecto a las anteriores. Por último, la actividad de la fusión *ecpR*-10 (-66 a +198) es similar a la de las fusiones *ecpR*-3 y *ecpR*-4. Este mismo comportamiento se observa al analizar la actividad de las fusiones en EPEC (Fig. 18B), aunque las actividades obtenidas tienden a ser más altas con respecto a las obtenidas en EHEC, lo cual podría deberse, entre otras cosas, a que en EPEC se expresa también el P2. Así mismo se puede



observar que la actividad de las fusiones *ecpR-3* y *ecpR-4* de ambas cepas disminuye en las mutantes en *ecpR*, mientras que la actividad de las fusiones *ecpR-8* y *ecpR-10* no se afecta. Estos resultados indican que el comportamiento de las fusiones en ambas cepas es similar independientemente de los cambios que existen entre ellas. Por otro lado, sugieren también que EcpR regula de manera positiva la expresión del operón.

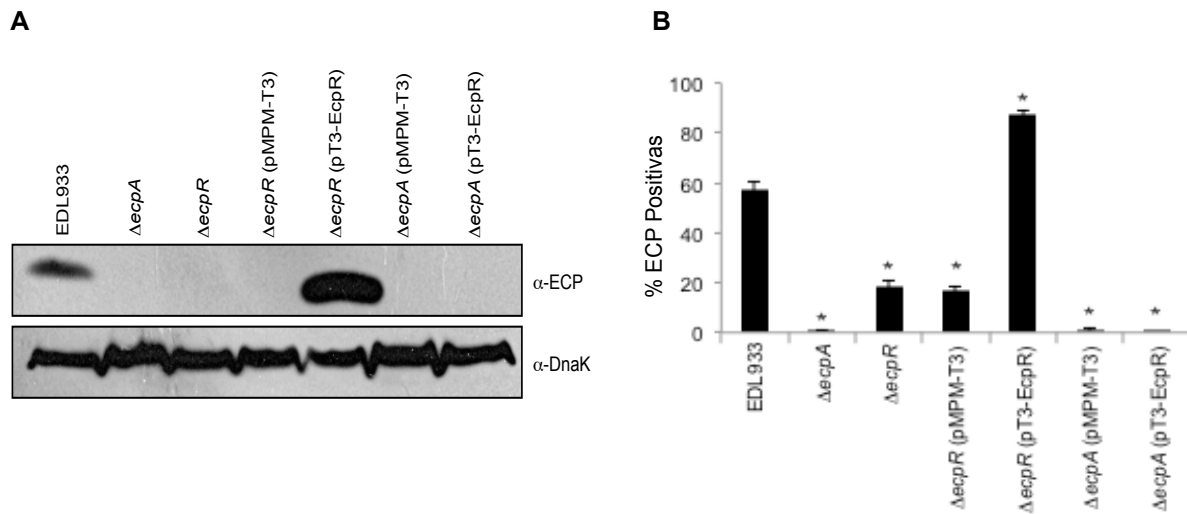


**Fig. 18.** La expresión de *ecp* es similar en EPEC y EHEC. **A)** Ensayo de actividad de CAT con las fusiones *ecpR-3*, *ecpR-4*, *ecpR-8* y *ecpR-10* de EHEC en las cepas de EHEC silvestre y  $\Delta*ecpR*$ . **B)** Ensayo de actividad de CAT con las fusiones *ecpR-3*, *ecpR-4*, *ecpR-8* y *ecpR-10* de EPEC en las cepas de EPEC silvestre y  $\Delta*ecpR*$ . Las cepas resultantes fueron crecidas en medio DME a 30°C en estático. Las gráficas son el resultado de tres experimentos independientes por duplicado.

#### 6.4 EcpR regula de manera positiva la expresión de *ecp*

Como se mencionó anteriormente, EcpR es un probable regulador positivo de la expresión del operón *ecp*. Para corroborar el papel de EcpR en la regulación del operón *ecp*, se analizó la expresión de la subunidad principal (EcpA) en la cepa silvestre y la mutante en *ecpR* mediante “western blot” (Fig. 19A). La expresión de EcpA claramente disminuye en la mutante en *ecpR*, mientras que aumenta, con respecto a la expresión observada en la cepa silvestre, al complementar con un plásmido que sobreexpresa a EcpR. Este mismo efecto se observó por citometría de flujo cuando se analizó la producción de ECP en estas cepas utilizando anticuerpos secundarios acoplados al fluoróforo Alexa Fluor 488 (Fig. 19B). Como se esperaba, no se detecta producción de ECP en la cepa mutante en *ecpA*, incluso cuando se transforma con el plásmido que

expresa a EcpR o con el vector sólo. En la mutante en *ecpR* la producción de ECP se reduce 67% con respecto a la cepa silvestre, pero cuando se complementa con el plásmido que expresa a EcpR, la producción aumenta alrededor del 50% con respecto a la cepa silvestre, corroborando el papel de EcpR como regulador positivo de *ecp*.



**Fig. 19.** EcpR regula de manera positiva la expresión de EcpA. **A)** “Western blot” con extractos totales de las cepas EHEC EDL933 silvestre,  $\Delta$ *ecpR* y  $\Delta$ *ecpR*/ pGTG crecidas 9 hr en medio DME a 26°C sin agitación. La detección se realizó con un anticuerpo policlonal anti-ECP a una dilución 1:15,000. DnaK se detectó como control de carga con un anticuerpo monoclonal a una dilución de 1:10,000. **B)** Cuantificación de la producción de ECP por citometría de flujo con las cepas EHEC EDL933 silvestre,  $\Delta$ *ecpA*,  $\Delta$ *ecpR*,  $\Delta$ *ecpR*/pMPPM-T3,  $\Delta$ *ecpR*/pT3-180EcpR,  $\Delta$ *ecpA*/pMPPM-T3 y  $\Delta$ *ecpA*/pT3-180EcpR. La gráfica es el resultado de 3 experimentos diferentes realizados por duplicado.

## 6.5 Mutaciones en el HTH afectan la actividad de EcpR

Para obtener evidencia de que la actividad de EcpR depende de su capacidad de unirse al DNA, generamos mutaciones puntuales en residuos conservados del dominio de unión a DNA predicho para EcpR (Fig. 20B) basándonos en un alineamiento con las proteínas mejor caracterizadas de la familia LuxR (Fig. 20A). De igual manera se generó una mutante en el residuo D60, el cual está conservado en reguladores de respuesta que son fosforilados.

**A**

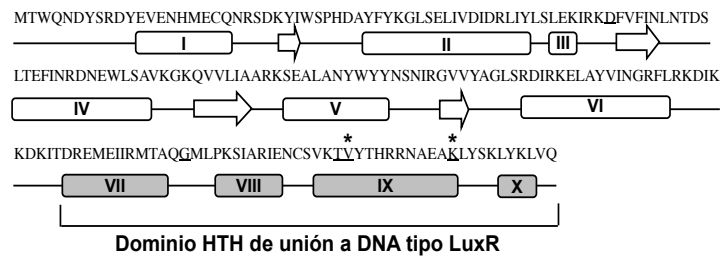
```

NarL  LRLAAELDFDMLLLDLNMMKGMNG-----LDTLRLAIREAGVDARIVFTVSDDKGDVFN 102
FixJ  LAFAFDVVRNGVLVTDLRMPDMSG-----VELLRNIGDLKINIPSIITGHGDVPMAVE  92
UhpA  LAGLPGRGVQVCICDISMPDISG-----LELLSGLPKG---MATIMLSVHDSPALVEQ  89
GerE  ----- 1
MalT  ERLMSDINRNLLLNLYWQAGRKSDAQRVLDLALMIAKNTGFI SHFVIEGEAMAQQERQ  780
LuxR  YYDDAGLLLEYDFVVDYKSHHSPINWNVFEKKTIKKESPNVIKEAQESGLITGFSFPIHT 128
EcpR  LDRLIYLSLEKIRKDFVFINLNT-----DSELTFFINRDNEWLSAVKKGQVVLIAARK  97
RmbA  LDRNHLLSSGPFVDFSEFPNLR-----FTDQWADSLADSGMHIIVLISPRS 102

NarL  VERRAGADGYIIRIMEPERLEHIRQAATGQMTESPOETQILAQALRGDDRSKSLDELTEFR 162
FixJ  AMKAGAVDFIRKPFEDTVIEAIERASEHLVAABADVDANDIRAR-----LQTLSEER 145
UhpA  ALNAGARCFIRKRCSPDELIAAVHTVATGGCYLPDLAKKLAGSRQ-----DPLTKRR 141
GerE  -MKE--KEEQSN--P----- 15
MalT  LIQLNTLPEIQHRAQRILREINQHRRHKFAHFDENFVERLLNHPEVPELIR-TSPLTOR 839
LuxR  ANNGFGMLSFASHDKDIYTDLSFLHASTNVPLMLPSIVDNYQKINTTRKKS--SILTKRR 186
EcpR  SEALANYWYVYNSNIRGVVYAGLSRDIRKELAYVINGRFLRKDKD-----KTLDFR 148
RmbA  LTPLANYWYIKSNKIQGITYSDDDDIVQQQKMHRLFTGLANSKRG-----RTINNYT 154

NarL  ERQILRQTAHGYSNKMIAARKLLHTEGTVKVHKRVLHKLGMRSKVEEAAVWAVENDLV-- 219
FixJ  ERQVLSAVVACLEFNKSIAYDLDLISPEFVHVHRANVMKMKAKSLPHLVRMALAGGFGPS 204
UhpA  ERQVAEKLAGCMAVKKEIAAELGHSSEKTVHVHRANLMEKLGVSNDVELARRMFDGW--- 196
GerE  ERVVEFELEVQDKTKKETAASELFISEKTVRNHHSNANMCKLGVKCRSQAQVVELRMGEL  74
MalT  EMDVLLGLIYSQYVNEQTAGELVAATIKKTHRNLYKLGVAHRQDAVQHAQQLLKMMGY  899
LuxR  EKECLAWASECKSTWDISKILGCSERTVTFHLLTNTQMKINTTNECQSSKALLTGAINCP 246
EcpR  EMEITRMTAQCMLEPKSIARIENCSVKTVYTHRRNAEAKLYSKLYKLVO----- 196
RmbA  EFTILKRFVSCVLSIQGVNIDNIDIKKLMVHKLRLENKLGHSIHKLISNIL----- 205

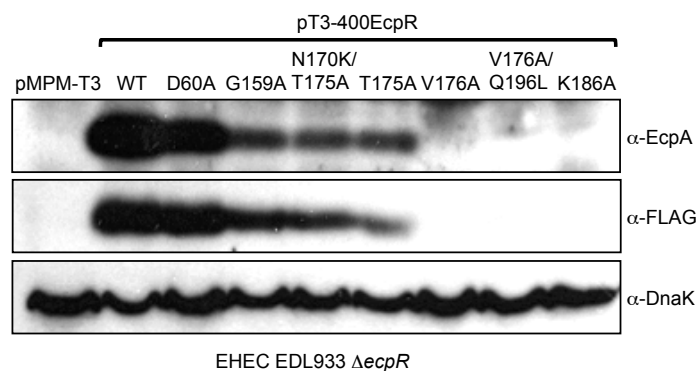
```

**B**

**Fig. 20.** EcpR tiene un dominio HTH de unión a DNA tipo LuxR. **A)** Alineamiento múltiple de EcpR de EHEC EDL933, NarL de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, FixJ de *Sinorhizobium meliloti*, UhpA de EHEC EDL933, GerE de *Bacillus subtilis*, MalT de *E. coli* K-12, LuxR de *Vibrio fischeri* ES114 y RmbA de *S. enterica* serovar Typhimurium, hecho usando el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Los aa idénticos están indicados en blanco y los aa similares en gris. Los asteriscos indican los residuos mutados. **B)** Representación esquemática de la estructura secundaria predicha de EcpR usando el servidor PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Las flechas indican las hojas beta y los rectángulos representan las alfa hélices. Los aa reemplazados por alaninas están subrayados. Los asteriscos muestran residuos que afectan la actividad de EcpR cuando son reemplazados por alaninas. Las hélices VII, VIII, IX y X que corresponden al probable dominio HTH de EcpR están en gris.

Mediante mutagénesis dirigida se sustituyeron por alaninas los residuos D60, G159, T175, V176 y K186. Se analizó la capacidad de restaurar la expresión de EcpA en la cepa EHEC EDL933  $\Delta$ *ecpR* de los plásmidos resultantes pT3-400EcpR-D60A, pT3-400EcpR-G159A, pT3-400EcpR-N170K-T175A, pT3-400EcpR-T175A, pT3-400EcpR-V176A, pT3-400EcpR-V176A-Q196L y pT3-400EcpR-K186A. Éstos expresan a las diferentes mutantes, incluyendo dos dobles mutantes espontáneas, etiquetadas con un triple epítipo FLAG. Como se observa en la Fig. 21, únicamente las mutantes en los residuos D60,

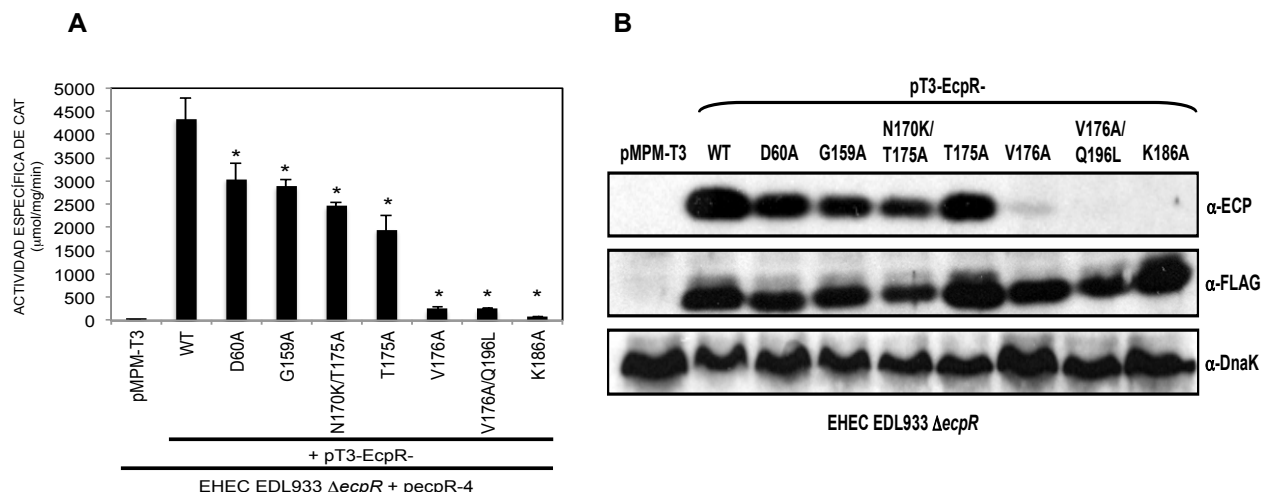
G159 y T175, así como la doble mutante N170K/T175A, restauran la expresión de EcpA, aunque no al mismo nivel que la proteína silvestre. Este efecto se debe a que su expresión es menor con respecto a la de la proteína silvestre. Por su parte, las mutantes en los residuos V176A y K186A, así como la doble mutante V176A/Q196L no restauran la expresión de EcpA, lo cual se debe a que estas proteínas no se expresan.



**Fig. 21.** Mutaciones en el dominio HTH de EcpR afectan la autorregulación. “Western blot” con la cepa EHEC EDL933  $\Delta$ *ecpR* transformada con el plásmido pT3-400EcpR silvestre o conteniendo los cambios D60A, G159A, N170K-T175A, T175A, V176A, V176A-Q186L y K186A. Las proteínas EcpR etiquetadas fueron detectadas con anticuerpos anti-FLAG. DnaK se detectó como control de carga.

La falta de expresión de las mutantes V176A, V176A/Q196L y K186A puede deberse a que las proteínas son inactivas y, dado que estas construcciones contienen la región reguladora de *ecpR* y por lo tanto, dependen de EcpR, no pueden autorregularse. Para evitar este efecto se construyeron versiones de estos plásmidos que no llevan la región reguladora y abarcan únicamente hasta la posición -59, como se menciona en Materiales y Métodos. Se analizó la capacidad de activar a la fusión *ecpR*-4 en la cepa EDL933  $\Delta$ *ecpR* (Fig. 22A) de los plásmidos resultantes pT3-EcpR-D60A, pT3-EcpR-G159A, pT3-EcpR-T175A, pT3-EcpR-V176A, pT3-EcpR-K186A, pT3-EcpR-N170K/T175A y pT3-EcpR-V176A/Q196L, los cuales expresan a las proteínas EcpR etiquetadas con un triple epítipo FLAG. Como se puede observar, las mutantes en los residuos D60, G159 y T175, así como la doble mutante N170/T175, son capaces de activar la expresión de la fusión, aunque a niveles menores que la proteína silvestre. Mientras que las mutantes en los residuos V176 y K186 no fueron activas. Este resultado se corroboró por “western blot”,

donde se observa que estas mutantes no activan la expresión de EcpA, aun cuando se expresan de manera similar a la proteína silvestre (Fig. 22B).

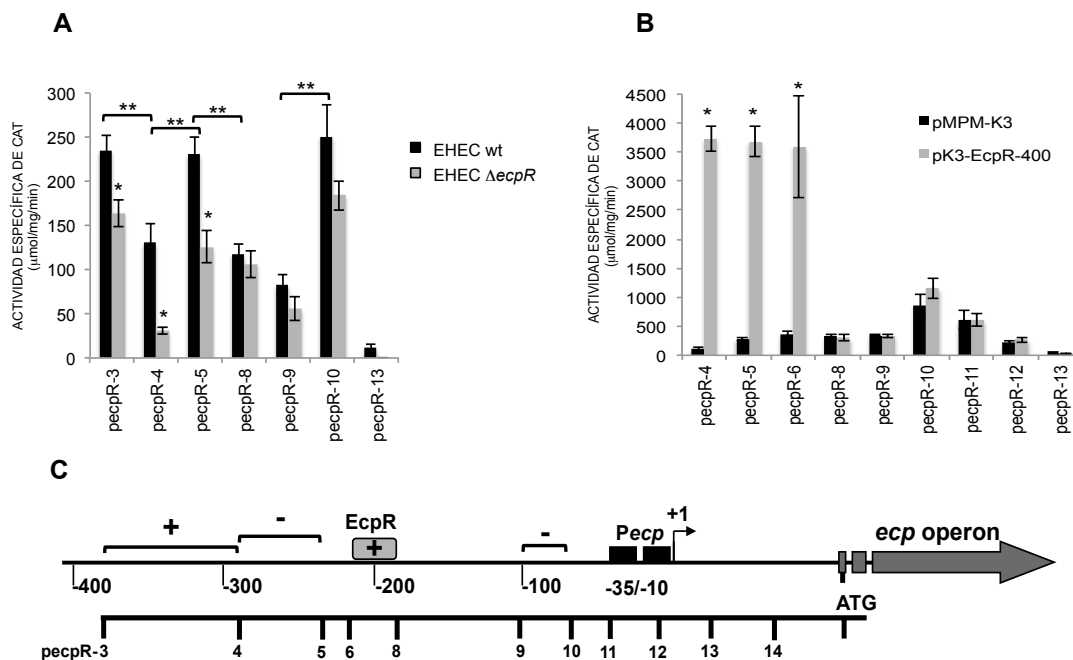


**Fig. 22.** Mutaciones en el dominio HTH afectan la actividad de EcpR. **A)** Ensayo de actividad de CAT con la cepa EHEC EDL933  $\Delta ecpR$  transformada con la fusión *pecpR-4* y complementada con el plásmido pT3-EcpR, que codifica para EcpR silvestre o derivados de éste conteniendo los genes para las mutantes D60A, G159A, N170K-T175A, T175A, V176A, V176A-Q186L y K186A. **B)** “Western blot” con la cepa EHEC EDL933  $\Delta ecpR$  transformada con el plásmido pT3-EcpR silvestre o conteniendo los cambios D60A, G159A, N170K-T175A, T175A, V176A, V176A-Q186L y K186A. Las proteínas EcpR etiquetadas se detectaron con anticuerpos anti-FLAG. DnaK se detectó como control de carga.

## 6.6 La región reguladora de *ecp* contiene varios elementos reguladores

Para identificar elementos reguladores en la región reguladora de *ecp*, las fusiones construidas (Tabla 4) se introdujeron en la cepa de EHEC EDL933 y se analizó su expresión. Como se muestra en la Fig. 23A (barras negras), la fusión *ecpR-3* tuvo una actividad de aproximadamente 700 unidades, mientras que la fusión *ecpR-4* mostró una actividad de aproximadamente 200 unidades, lo que significa una disminución de aproximadamente 3 veces con respecto a la fusión *ecpR-3*, lo cual sugiere que en la región que se eliminó para generar la fusión *ecpR-4* se encuentra un sitio de regulación positiva. La fusión *ecpR-5* presentó una actividad similar a la de la fusión *ecpR-3*, que fue 3 veces más activa que la fusión *ecpR-4*, lo que sugiere la presencia de un sitio de regulación negativa en la región comprendida entre los extremos 5' de las fusiones *ecpR-*

4 y *ecpR-5*. La actividad de las fusiones *ecpR-8* y *ecpR-9* fue similar a la de la fusión *ecpR-4*, mientras que la de la fusión *ecpR-10* presentó un incremento de poco más de 2 veces con respecto a las dos anteriores, lo cual sugiere que en la región comprendida entre las fusiones *ecpR-9* y *ecpR-10* existe un sitio adicional de regulación negativa. Por último, la fusión *ecpR-13* presentó una actividad basal, lo cual se debe a que esta fusión no contiene la región promotora. Las regiones de regulación identificadas mediante este análisis se ilustran en la Fig. 23C.



**Fig. 23.** Identificación de elementos reguladores involucrados en la regulación del operón *ecp*. **A)** Ensayo de actividad de CAT con las cepas EDL933 silvestre y  $\Delta ec p R$  transformadas con las fusiones *ecpR-3*, *ecpR-4*, *ecpR-5*, *ecpR-8*, *ecpR-9*, *ecpR-10* y *ecpR-13* crecidas en medio DME a 37°C en agitación por 6 hr. **B)** Ensayo de actividad de CAT con la cepa EDL933  $\Delta ec p R$  transformada con las fusiones *ecpR-4*, *ecpR-5*, *ecpR-6*, *ecpR-8*, *ecpR-9*, *ecpR-10*, *ecpR-11*, *ecpR-12* y *ecpR-13*, complementada con el vector pMPM-K3 y el plásmido pK3-EcpR-400. **C)** Esquema de la región reguladora del operón *ecp* donde se indica la posición 5' de cada fusión transcripcional, así como la posición aproximada de los diferentes elementos de regulación positiva (+) o negativa (-) identificados por el análisis de las eliminaciones. También se indican las cajas -35 y -10 del promotor (*Pecp*) predicho con base en el sitio de inicio de la transcripción (flecha en ángulo) y la posible secuencia de reconocimiento de EcpR (ver abajo).

Con el fin de identificar el sitio donde actúa EcpR, se analizó la expresión de las fusiones transcripcionales en la cepa EDL933 mutante en *ecpR*. La Fig. 23A (barras

---

---

grises) muestra que la actividad de las fusiones en la cepa mutante se redujo ligeramente para la fusión *ecpR-3* y en forma más evidente en el caso de las fusiones *ecpR-4* y *ecpR-5* con respecto a la cepa silvestre, y que dicha reducción ya no se observó para las fusiones *ecpR-8*, *ecpR-9*, *ecpR-10* y *ecpR-13*. Este resultado corroboró que EcpR regula de manera positiva su propia expresión actuando probablemente corriente arriba de la posición -188.

### **6.7 EcpR se une a dos secuencias TTCCT repetidas directas**

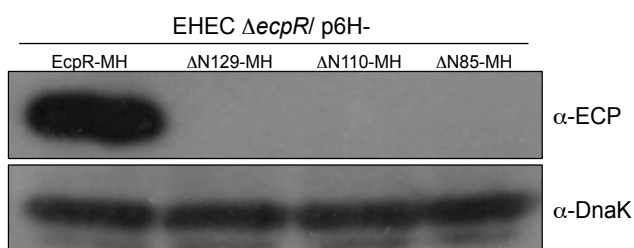
Los resultados anteriores sugieren fuertemente que EcpR actúa como un regulador positivo, no sólo de su propia expresión sino también de la de los genes corriente abajo, por lo que el siguiente objetivo fue identificar la región donde EcpR está actuando. Para esto, primero delimitamos la secuencia involucrada en la activación mediada por EcpR mediante ensayos de complementación con el plásmido pK3-EcpR-400 de la cepa de EHEC mutante en *ecpR* con las fusiones *ecpR-4*, *ecpR-5*, *ecpR-6*, *ecpR-8*, *ecpR-9*, *ecpR-10*, *ecpR-11*, *ecpR-12* y *ecpR-13* (Fig. 23B). Observamos que sólo las fusiones *ecpR-4*, *ecpR-5* y *ecpR-6* aumentan considerablemente su expresión en presencia de EcpR, lo que sugiere que este regulador podría estar actuando entre las posiciones -212 y -188.

Para definir la secuencia de unión de EcpR, ésta fue fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP) o etiquetada con cola de His para purificarla. Las construcciones resultantes complementaron a la mutante en *ecpR* (datos no mostrados), demostrando la funcionalidad de las fusiones MBP-EcpR, 6H-EcpR y EcpR-6H. Sin embargo, aunque se logró su purificación, no pudimos ver que ninguna de las fusiones se uniera al DNA *in vitro* mediante experimentos tipo EMSA o “footprinting” (datos no mostrados). Esto era hasta cierto punto esperado, ya que varias proteínas de esta familia son incapaces de unir DNA *in vitro* en ausencia de su correspondiente autoinductor, como por ejemplo TraR (Zhu & Winans, 2001). En el caso de LuxR se había visto que la proteína completa formaba cuerpos de inclusión cuando se sobreexpresaba (Kaplan & Greenberg, 1987). Sin embargo, posteriormente se observó que, al hacer eliminaciones seriales de la proteína en el extremo N-terminal, dos versiones trucas que contenían 30 y 20 aa corriente arriba del dominio HTH eran capaces de activar a niveles similares o al doble, respectivamente, que la proteína silvestre (Choi & Greenberg, 1991), y que la primera es capaz de unirse al

---

---

DNA en ausencia de autoinductor *in vitro* (Stevens et al, 1994). Tomando en cuenta estos antecedentes, construimos versiones truncas de EcpR denominadas EcpR $\Delta$ N85, EcpR $\Delta$ N110 y EcpR $\Delta$ N129 (Tabla 4), las cuales no poseen distintas porciones del extremo N-terminal y están etiquetadas con una cola de His en el N-terminal y la etiqueta MycHis en el C-terminal. A diferencia de lo observado para LuxR, las versiones truncas de EcpR no fueron capaces de complementar a la mutante de EHEC en *ecpR* al analizarlas por “western blot” (Fig. 24), a pesar de que se expresan de manera similar a la proteína silvestre (datos no mostrados).

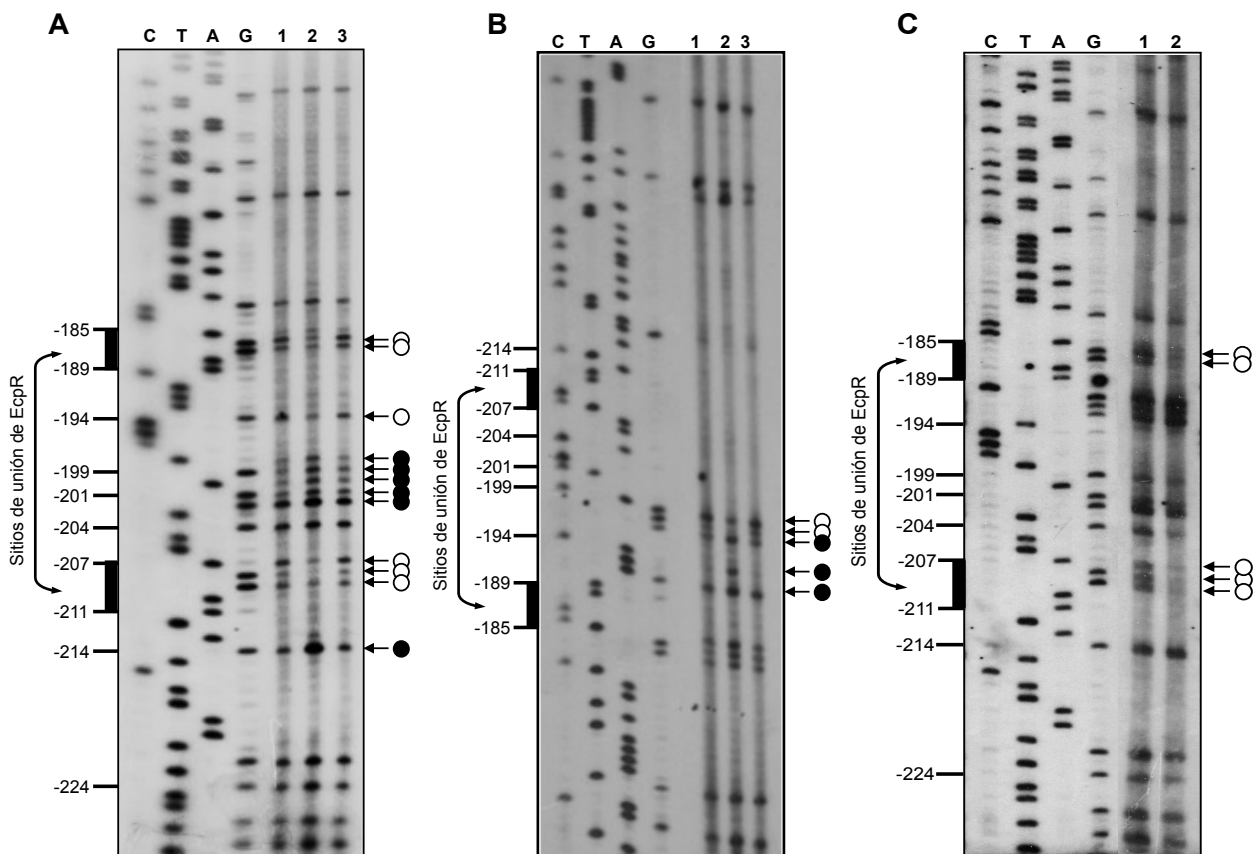


**Fig. 24.** Versiones truncas de EcpR no son activas. “Western blot” con la cepa de EHEC EDL933  $\Delta$ *ecpR* complementada con los plásmidos p6H-EcpR-MH, p6H- $\Delta$ N129-MH, p6H- $\Delta$ N110-MH y p6H- $\Delta$ N85-MH. DnaK fue detectada como control de carga.

Ante la imposibilidad de definir el sitio de pegado *in vitro* utilizando la proteína purificada, probablemente por la falta de un elemento adicional presente en la célula, ya sea otra proteína o un metabolito necesarios para la actividad de EcpR, se decidió realizar experimentos de “footprinting” *in vivo* como se describe en Materiales y Métodos. La cepa EHEC EDL933  $\Delta$ *ecpR* con la fusión *ecpR*-4 y complementada con el vector pMPM-T3 o plásmidos que expresan a EcpR silvestre (pT3-EcpR) o una mutante inactiva (pT3-EcpR-K186A) se creció en condiciones que permiten la expresión del promotor de *ecp* previo al tratamiento con DMS. Los patrones generados por footprinting (Fig. 25A) mostraron que cuando está presente la proteína silvestre (carril 2), los residuos de guanina en las posiciones -186, -187, -194 y -207 a -209, con respecto al inicio de la transcripción, se protegieron de metilación, mientras que los residuos entre las posiciones -198 y -202 se hipermetilaron. En contraste, en presencia de la proteína mutante EcpR-K186A (carril 3), no se observa ningún cambio en el patrón de metilación con respecto a la cepa que lleva el vector pMPM-T3 (control negativo, carril 1). El patrón de metilación de la cadena

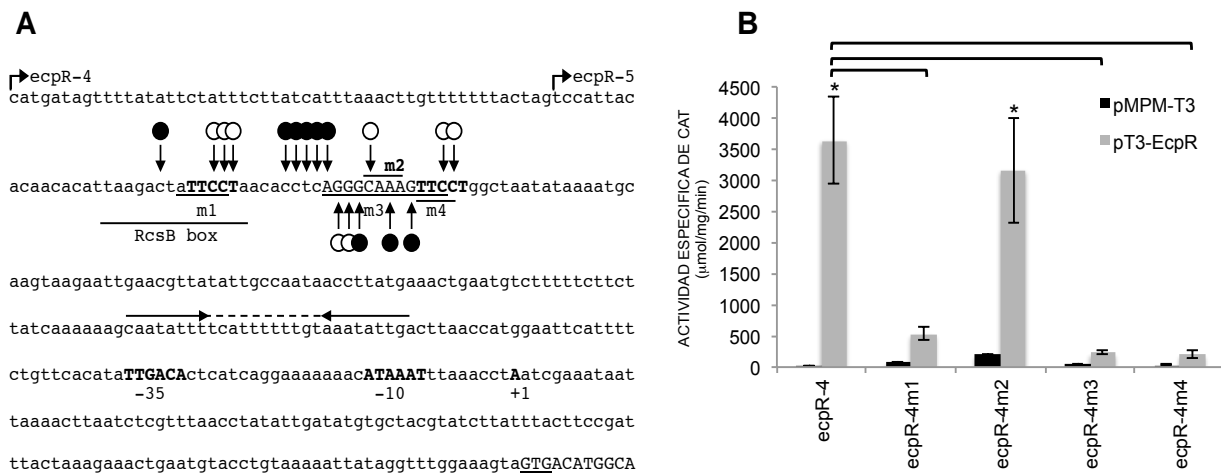


codificante también se analizó (Fig. 25B). En este caso, también se observan cambios en el patrón de metilación en presencia de la proteína silvestre (carril 2) entre las posiciones -197 a -190, pero no en presencia del vector vacío o del plásmido que expresa a la proteína EcpR-K186A (carriles 1 y 3, respectivamente). Estos resultados muestran que la mayoría de las bases protegidas por EcpR están contenidas en dos secuencias repetidas directas TTCCT separadas por un espaciador de 17 pb donde varias bases se hipermetilan en presencia de EcpR. Estas cajas TTCCT se localizan entre las posiciones -185 y -189 (caja proximal) y -207 y -211 (caja distal).



**Fig. 25.** Identificación del sitio de unión de EcpR. (A a C) Ensayo de protección a DMS *in vivo*. Cultivos bacterianos de EHEC EDL933  $\Delta ecpR$  conteniendo la fusión *ecpR*-4 (A y B) o *ecpR*-4m2 (C) más el vector pMPM-T3 (carriles 1) o los plásmidos que expresan a EcpR silvestre (pT3-EcpR, carriles 2) o la mutante inactiva EcpR K186A (pT3-EcpR-K186A, carriles 3), fueron expuestos a DMS y los plásmidos fueron extraídos y tratados como se menciona en Materiales y Métodos. Las reacciones de “primer extension” se hicieron con los oligonucleótidos pKK-BHI-F (A y C) y *ecpR*-3R (B). Los círculos blancos indican sitios de protección, mientras que los círculos negros indican sitios de hipermetilación, las guaninas que comprenden los sitios de unión de EcpR están indicadas.

Para determinar la importancia de estas secuencias repetidas directas en la actividad de EcpR, se construyeron las fusiones mutantes *ecpR-4m1*, *ecpR-4m2*, *ecpR-4m3* y *ecpR-4m4*, las cuales llevan mutaciones en las cajas TTCCT y/o en la región espaciadora (Tabla 4 y Fig. 26A). Estas fusiones se probaron en ensayos de complementación en la cepa EHEC EDL933  $\Delta ecpR$  con el plásmido pT3-EcpR a partir del cual se expresa EcpR silvestre. Como se puede observar en la Fig. 26B, la fusión *ecpR-4m2*, que tiene mutadas 4 pb corriente arriba de la caja TTCCT proximal, alcanza una actividad de aproximadamente 3500 unidades, al igual que la fusión silvestre *ecpR-4*, lo cual sugiere que la región espaciadora no está involucrada en la actividad de EcpR. Esta observación es consistente con el “footprinting” *in vivo* de la fusión *ecpR-4m2*, donde se observa que dichos cambios no afectan la interacción de EcpR con las cajas TTCCT (Fig. 25C). Por el contrario, las fusiones *ecpR-4m1* y *ecpR-4m4*, las cuales tienen cambios en las cajas TTCCT, y la fusión *ecpR-4m3*, la cual tiene cambios en 9 bases de la región espaciadora, así como en la caja TTCCT proximal, no se activaron en presencia de EcpR.



**Fig. 26.** Las cajas TTCCT son necesarias para la activación del promotor de *ecp* por EcpR. **A)** Secuencia de la región reguladora de *ecpR*. Las flechas discontinuas indican los límites 5' de las fusiones *ecpR-4* y *ecpR-5*, los círculos blancos indican las bases protegidas en el “footprinting” *in vivo*, los círculos negros indican las bases hipermetiladas. Las bases mutadas en las fusiones *ecpR-4m1*, *ecpR-4m2*, *ecpR-4m3* y *ecpR-4m4*, así como la caja RcsB están subrayadas. Las flechas horizontales indican la secuencia repetida invertida y la línea discontinua indica la región espaciadora. **B)** Ensayo de actividad de CAT con la cepa EHEC EDL933 transformada con las fusiones *ecpR-4m1*, *ecpR-4m2*, *ecpR-4m3* y *ecpR-4m4* y complementada con el vector pMPPM-T3 o el plásmido pT3-EcpR.

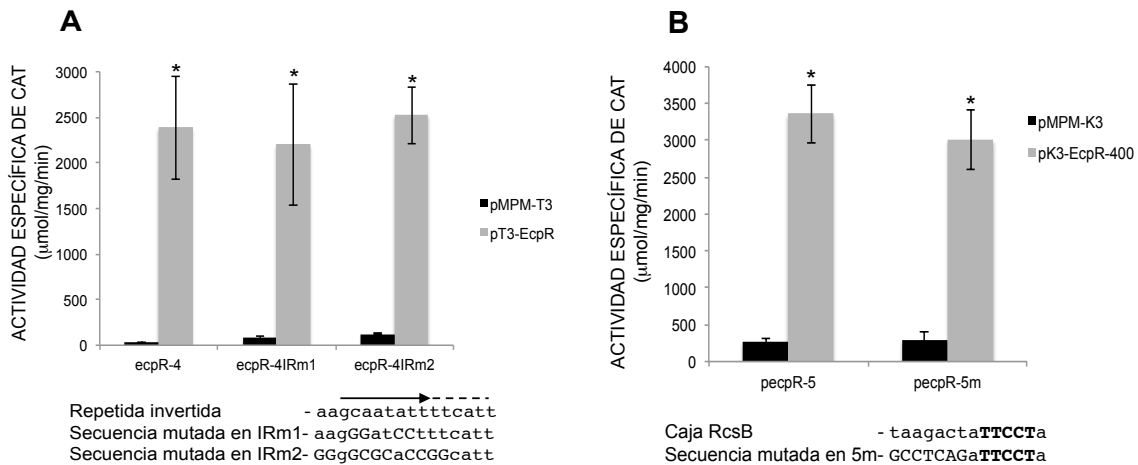
---

---

Estos resultados sugieren que las cajas TTCCT son importantes para la unión de EcpR a la región reguladora de *ecp* y la subsiguiente activación del promotor.

### **6.8 Mutaciones en la caja RcsB o en una secuencia repetida invertida no afectan la actividad de EcpR**

Nuestro mapeo fino reveló que los sitios de unión de EcpR (cajas TTCCT) comprenden secuencias repetidas directas que se encuentran alejadas del promotor, entre las posiciones -211 y -185, características atípicas para reguladores de la familia LuxR, los cuales reconocen secuencias repetidas invertidas localizadas cerca de la región promotora. Un análisis de la secuencia de la región reguladora de *ecpR* reveló que existe una secuencia repetida invertida localizada entre las posiciones -97 y -71 (Fig. 26A); sin embargo, la expresión de fusiones que contienen esta secuencia, pero no las cajas TTCCT, ya no depende de EcpR (fusiones *ecpR*-8 y *ecpR*-9, Fig. 23A y B). Para explorar en más detalle si dicha secuencia participa o no en la regulación mediada por EcpR, se construyeron las fusiones *ecpR*-4IRm1 y *ecpR*-4IRm2, las cuales llevan 4 y 8 cambios, respectivamente, en el extremo izquierdo de la secuencia repetida invertida y contienen ambas cajas TTCCT (Fig. 27A). Ambas fusiones presentaron actividad en la cepa EDL933  $\Delta$ *ecpR* complementada con el plásmido pT3-EcpR, alcanzando niveles de expresión similares al de la fusión *ecpR*-4, confirmando que esta secuencia no interviene en la regulación mediada por EcpR. La naturaleza de esta secuencia sugiere que puede actuar como el sitio de unión de algún regulador; sin embargo, a la fecha no hay evidencia de que tenga función en la regulación de *ecp*.

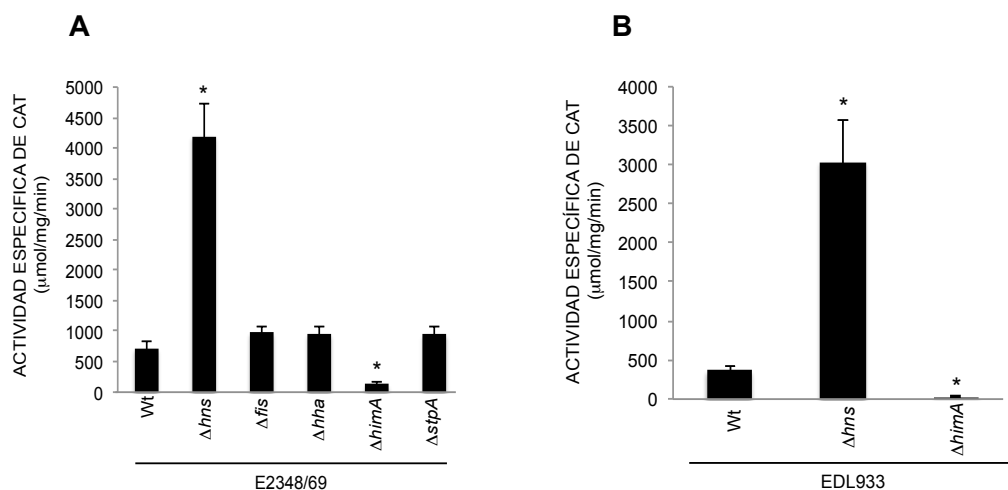


**Fig. 27.** Análisis de elementos reguladores de *ecp* por mutagénesis sitio-dirigida. **A)** Análisis de las secuencias repetidas invertidas. Ensayo de actividad de CAT con la cepa EDL933  $\Delta$ *ecpR* transformada con las fusiones *ecpR*-4, *ecpR*-4IRm1 y *ecpR*-4IRm2 y complementada con el vector pMPPM-T3 o el plásmido pT3-EcpR. Las secuencias silvestre y mutantes de la región comprendida en la parte izquierda de la repetida invertida se indican debajo de la gráfica. **B)** Análisis de la caja RcsB. Ensayo de actividad de CAT con la cepa EDL933  $\Delta$ *ecpR* transformada con las fusiones *ecpR*-5 y *ecpR*-5m y complementada con el vector pMPPM-K3 o el plásmido pK3-EcpR-400. Las secuencias silvestre y mutante de la caja RcsB se indican abajo.

Por otro lado, recientemente, Lehti y colaboradores (2012) reportaron que el regulador de respuesta RcsB regula de manera positiva la expresión del operón *ecp* en la cepa NMEC. Esta proteína regula la expresión del operón *ecp* (*mat*) uniéndose a una caja RcsB centrada a 178 pb corriente arriba de la caja -35 del P1, y cuya secuencia consenso es TAAGAATATTCCTA. Coincidentemente, la caja TTCCT distal forma parte de la caja RcsB (Fig. 26A). Con el fin de descartar que la protección que se observa de esta región por “footprinting” se deba al pegado de RcsB y no al pegado de EcpR, se generó la fusión *ecpR*-5m, la cual contiene la misma región que la fusión *ecpR*-5 pero lleva mutaciones en la caja RcsB sin afectar el sitio de unión de EcpR (Fig. 27B). Como se puede observar, al analizar la expresión de la fusión en un ensayo de complementación, la actividad de la fusión *ecpR*-5m fue similar a la de la fusión *ecpR*-5. En su conjunto, nuestros resultados indican que la caja RcsB no es esencial para la activación de *ecp* mediada por EcpR en EHEC.

## 6.9 IHF y H-NS regulan la expresión del operón *ecp*

La regulación de los operones fimbriales es compleja y por lo regular involucra, además de los elementos codificados dentro del operón, reguladores globales tales como IHF, H-NS y Lrp (Clegg et al, 2011). Además de la regulación mediada por EcpR, quisimos determinar qué otros reguladores están involucrados en la regulación de *ecp*. Para esto, analizamos la expresión de la fusión *ecpR-1* en la cepa de EPEC E2348/69 y sus mutantes isogénicas en *hns*, *fis*, *hha*, *himA* y *stpA*. Como se puede observar en la Fig. 28A, la expresión de la fusión en las cepas  $\Delta fis$ ,  $\Delta hha$  y  $\Delta stpA$  es similar a la observada en la cepa silvestre, lo que sugiere que las proteínas codificadas por estos genes no regulan a *ecp*. En contraste, la actividad aumenta aproximadamente 11 veces en la mutante en *hns* con respecto a la cepa silvestre, mientras que disminuye aproximadamente 8 veces en la mutante en *himA*. Este resultado sugiere que H-NS regula de manera negativa la expresión de *ecp*, mientras que IHF lo hace de manera positiva. Este mismo efecto se observa al analizar la expresión de la fusión *ecpR-1* de EHEC en las cepas wt,  $\Delta hns$  y  $\Delta himA$  de EHEC EDL933 (Fig. 28B).



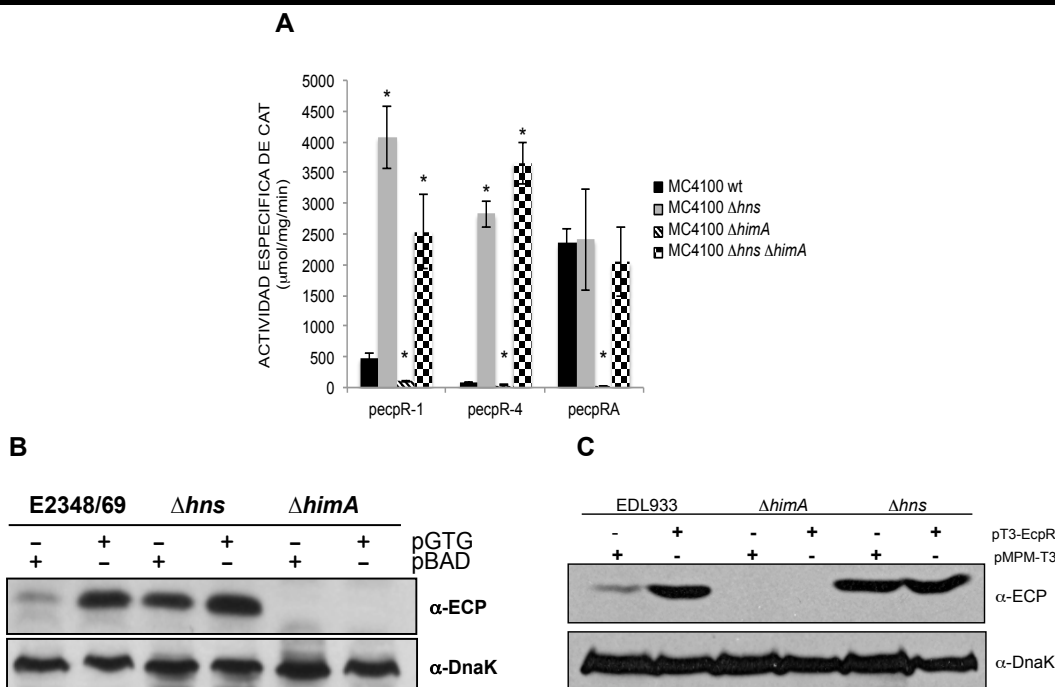
**Fig. 28.** El operón *ecp* es regulado positivamente por IHF y negativamente por H-NS. **A)** Ensayo de actividad de CAT con las cepas de EPEC E2348/69 silvestre,  $\Delta hns$ ,  $\Delta fis$ ,  $\Delta hha$ ,  $\Delta himA$  y  $\Delta stpA$  transformadas con la fusión *ecpR-1P*. **B)** Ensayo de actividad de CAT con las cepas de EHEC EDL933 silvestre,  $\Delta hns$  y  $\Delta himA$  transformadas con la fusión *ecpR-1H*. Las cepas fueron crecidas en medio DME a 26°C en estático toda la noche. Las gráficas son el resultado de tres experimentos independientes por duplicado.

---

---

Habiendo observado que tanto IHF como H-NS regulan la expresión de *ecp*, quisimos analizar cómo es que actúan. Para esto se realizaron ensayos con la cepa de *E. coli* K12 MC4100 silvestre (la cual no posee el operón *ecp*, ver abajo), así como las mutantes en *hns*, *himA* y la doble  $\Delta hns \Delta himA$  con las fusiones *ecpR-1*, *ecpR-4* y *ecpRA* (Tabla 4). Como se observa en la Fig. 29A, la actividad de las fusiones *ecpR-1* y *ecpR-4* aumenta 8.5 y 36.7 veces en la cepa  $\Delta hns$ , respectivamente, en comparación con la cepa silvestre, corroborando el papel de H-NS como regulador negativo. En el caso de la mutante en IHF se observó que las actividades disminuyeron 4.8 y 2.1 veces, respectivamente, en comparación con la cepa silvestre, lo que corrobora el papel de IHF como regulador positivo. Interesantemente, en la doble mutante  $\Delta hns \Delta himA$ , la actividad de ambas fusiones es similar a la obtenida en la mutante sencilla en *hns*, lo que sugiere que IHF regula positivamente eliminando la represión ejercida por H-NS, ya que en ausencia de ésta IHF no es necesaria.

Al analizar la expresión de la fusión *ecpRA* (la cual contiene todo el gen que codifica para EcpR y por lo tanto la expresa), se observó que la actividad obtenida en la cepa silvestre fue aproximadamente 30 veces mayor que la de la fusión *ecpR-4*, aun cuando ambas contienen el mismo extremo 5', lo cual se debe a que la primera expresa a EcpR y ésta aumenta la expresión de la fusión ya que se autorregula positivamente. En ausencia de H-NS se observó que la actividad es similar a la obtenida en la cepa silvestre, lo cual sugiere que el papel de EcpR también es el de quitar la represión por H-NS. Por el contrario, la actividad en la cepa  $\Delta himA$  es basal, lo que indica que IHF es necesaria para la activación mediada por EcpR. De acuerdo a estas observaciones, en la doble mutante  $\Delta hns \Delta himA$  se obtiene una actividad similar a la observada para las cepas silvestre y  $\Delta hns$ . Estos resultados sugieren que en ausencia de H-NS *ecp* puede expresarse aun cuando no estén presentes IHF y EcpR, y que la función de estas proteínas es la de eliminar la represión ejercida por H-NS.



**Fig. 29.** IHF es necesaria par la actividad de EcpR. **A)** Ensayo de actividad de CAT con las cepas *E. coli* K12 MC4100 silvestre,  $\Delta hns$ ,  $\Delta himA$  y  $\Delta hns\Delta himA$  transformadas con las fusiones *ecpR*-1, *ecpR*-4 y *ecpRA*, crecidas en medio DMEM a 37°C en agitación por 6 hr. La gráfica es el resultado de tres experimentos independientes por duplicado. **B)** “Western blot” con las cepas E2348/69 silvestre,  $\Delta hns$ , y  $\Delta himA$  transformadas con el vector pBAD/MyHis o el plásmido pGTG (Tabla 1). **C)** “Western blot” con las cepas EDL933 silvestre,  $\Delta hns$  y  $\Delta himA$  transformadas con el vector pMPM-T3 o el plásmido pT3-180EcpR (Tabla 1). EcpA fue detectada con anticuerpos anti-ECP, DnaK fue detectada como control de carga.

El papel de los tres reguladores en la expresión de *ecp* se corroboró mediante experimentos tipo “western blot” con las cepas de EPEC E2348/69 silvestre,  $\Delta hns$  y  $\Delta himA$  transformadas con el vector pBAD/MyHis y con el plásmido pGTG (el cual sobre expresa a EcpR; Tabla 4). En la Fig. 29B se observa que la expresión de EcpA es mayor en la cepa E2348/69 silvestre transformada con el plásmido pGTG, con respecto a la cepa transformada con el vector vacío, mientras que en la mutante en *hns* la expresión es similar independientemente de la presencia del vector o del plásmido pGTG. Interesantemente, no se detecta a EcpA en la mutante en *himA* aun en presencia del plásmido pGTG. Juntos, estos resultados confirman que la función principal de EcpR es la de contrarrestar, con ayuda de IHF, la regulación negativa mediada por H-NS sobre el promotor del operón *ecp* y que IHF es esencial para la actividad de EcpR. Lo mismo se

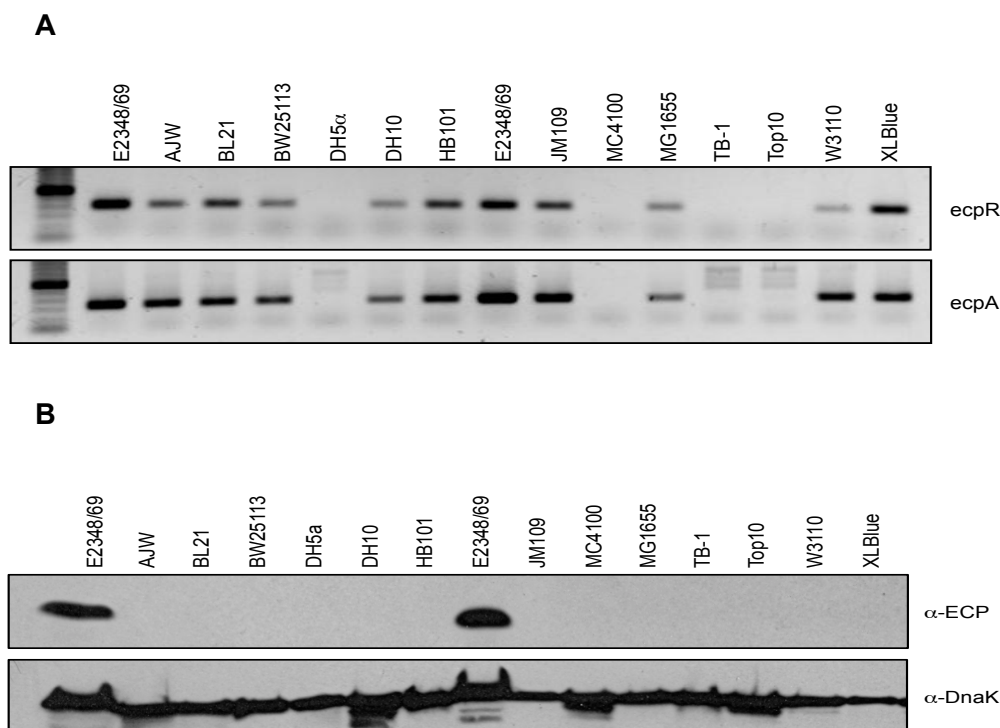
---

---

observa con las cepas silvestre,  $\Delta hns$  y  $\Delta himA$  de EHEC EDL933 transformadas con el vector pMPM-T3 o el plásmido pT3-EcpR (Fig. 29C).

### 6.10 Expresión de EcpA en cepas de *E. coli* de laboratorio

Para descartar que los resultados obtenidos con las cepas de *E. coli* K12 fueran debido al efecto de EcpR endógena, se determinó si las cepas de *E. coli* K-12 utilizadas comúnmente en el laboratorio poseen el operón *ecp* mediante PCR con oligonucleótidos específicos para *ecpR* y *ecpA* (Tabla 5). Como se puede observar en la Fig. 30A, en la mayoría de las cepas probadas se amplificaron productos correspondientes a *ecpR* y *ecpA*, excepto para el caso de las cepas DH5 $\alpha$ , MC4100, TB-1 y Top10. Al analizar la expresión de EcpA por western blot (Fig. 30B), se observó que ninguna de las cepas probadas expresa la proteína, aun aquellas que por PCR se vio que sí tienen los genes.



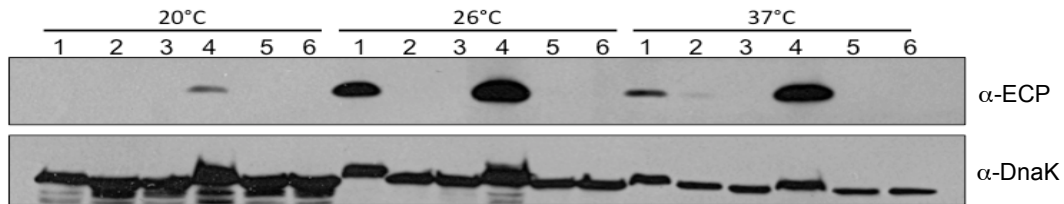
**Fig. 30.** Las cepas de *E. coli* K-12 no expresan EcpA. **A)** Productos de PCR amplificados con oligonucleótidos específicos para *ecpR* (panel superior) o *ecpA* (panel inferior). **B)** Western blot con las cepas de K-12 crecidas ON a 26°C en estático.



---

---

Sabiendo que la sobreexpresión de EcpR aumenta la expresión de EcpA, introdujimos el plásmido pK3-EcpR-400 en las cepas de *E. coli* K12 cuya secuencia se conoce (MG1655 y W3110) para ver si así logramos que EcpA se exprese. Como control positivo se utilizó la cepa de EPEC E2348/69 silvestre. Las cepas resultantes se crecieron en medio DME en estático a 20, 26 y 37°C (Fig. 31).



**Fig. 31.** La sobre expresión de EcpR no activa la expresión en las cepas K12. “Western blot” con las cepas de EPEC E2348/69 y *E. coli* K12 MG1655 y W3110 sin y con el plásmido pK3-EcpR-400 crecidas en medio DME en estático a diferentes temperaturas. Carriles:1- E2348/69, 2- MG1655, 3- W3110, 4- E2348/69 /pK3-EcpR-400, 5- MG1655 /pK3-EcpR-400, 6- W3110 /pK3-EcpR-400.

Llama la atención que en EPEC, EcpA se expresa bien a 26°C, menos a 37°C y no se expresa a 20°C. Cuando se sobreexpresa a EcpR se detecta expresión de EcpA en las 3 temperaturas, sin embargo, la expresión sigue siendo menor a 20°C, un poco más a 37°C y más a 26°C. Como se había visto anteriormente, no se detecta expresión de EcpA en ninguna de las *E. coli* K12 a ninguna temperatura, aún en presencia de EcpR sobreexpresada. Estos resultados indican que, aunque el operón *ecp* está conservado también en las cepas de laboratorio, a diferencia de EPEC y EHEC, éstas no expresan los genes en las condiciones probadas. Esto llama la atención, ya que las secuencias de las tres cepas están muy conservadas y, aunque existen ligeros cambios, regiones identificadas como importantes para la expresión de *ecp* (ej. las cajas TTCCT y la región promotora) están muy conservadas (Fig. 32). Sin embargo, cabe señalar que en el caso de las cepas de *E. coli* K12 existe una base extra entre las cajas -10 y -35, la cual podría estar afectando la expresión de *ecp* en estas cepas. Por otro lado, las regiones codificantes de *ecpR* y *ecpA* están muy conservadas y no contienen codones de paro que pudieran afectar la expresión de las proteínas.

```

MG1655          TAGTCCATCACACAGCGCATTAAGACTATTCCTAACACTTCAGGGCAAAGTTCCTGACCA
W3110          TAGTCCATCACACAGCGCATTAAGACTATTCCTAACACTTCAGGGCAAAGTTCCTGACCA
E2348/69       TAGTCCATTACACAACACATTAAGACTATTCCTAACACTTCAGGGCAAAGTTCCTGGCTA
*****  ***** * *****

MG1655          ATATAAAATGCAAGTAAGAATTGAACGTTATATGCCAATAACCTTATGAAACCAAATGT
W3110          ATATAAAATGCAAGTAAGAATTGAACGTTATATGCCAATAACCTTATGAAACCAAATGT
E2348/69       ATATAAAATGCAAGTAAGAATTGAACGTTATATGCCAATAACCTTATGAAACTGAATGT
*****  *****

MG1655          CTTTTTCTTCTTATCAAAAAAGCAATATTTTCAGTTTTTCTAAATATTGACTTAACCATT
W3110          CTTTTTCTTCTTATCAAAAAAGCAATATTTTCAGTTTTTCTAAATATTGACTTAACCATT
E2348/69       CTTTTTCTTCTTATCAAAAAAGCAATATTTTCATTTTTTGTAAATATTGACTTAACCATT
*****  *****

MG1655          GAATTCCTTTTCCGTTTCACATATTGACACTCATCGGGAAAAAACATAAAATTTAAGCCC
W3110          GAATTCCTTTTCCGTTTCACATATTGACACTCATCGGGAAAAAACATAAAATTTAAGCCC
E2348/69       GAATTCATTTTCTGTTTCACATATTGACACTCATCGGGAAAAAACATAAAATTTAAGCCC
*****  *****

MG1655          AATCGAAAATAAATAAA-CTTAATCTCGTTTAAACCTTTATTGATATGTACTACGTATCTT
W3110          AATCGAAAATAAATAAA-CTTAATCTCGTTTAAACCTTTATTGATATGTACTACGTATCTT
E2348/69       AATCGAAA-TAATAAAACCTTAATCTCGTTTAAACCTTATATTGATATGTACTACGTATCTT
*****  *****

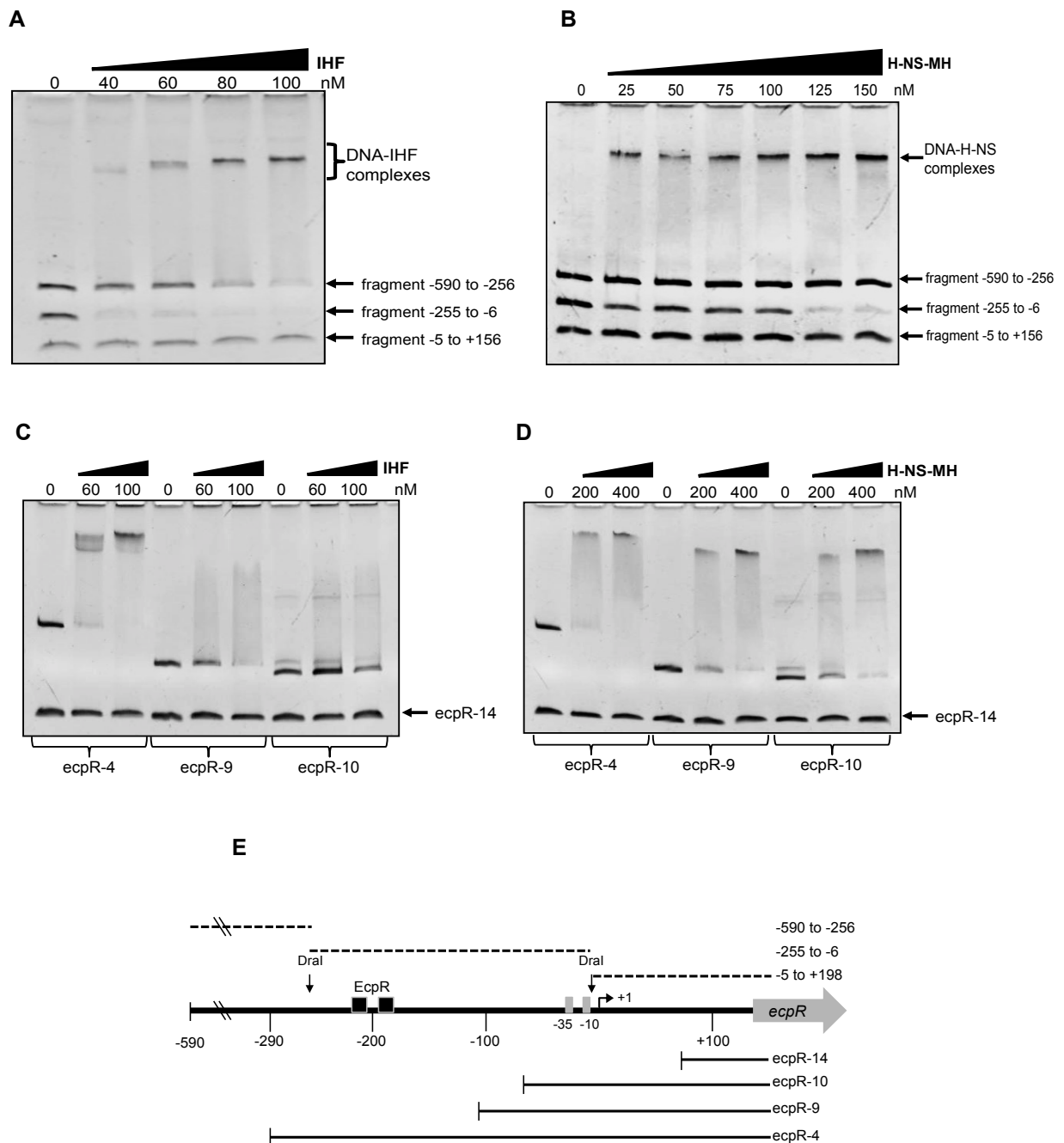
```

**Fig. 32.** Alineamiento de las regiones reguladoras de *ecp* de EPEC E2348/69 y *E. coli* K12 MG1655 y W3110. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. Las cajas -10 y -35 y el sitio de unión de EcpR están subrayados.

### 6.11 IHF y H-NS se unen sobre la región reguladora de *ecp*

El siguiente paso fue determinar si IHF y H-NS interactúan directamente con la región reguladora del operón *ecp* para llevar a cabo su función, para lo cual realizamos ensayos de retardamiento en gel (EMSA) con ambas proteínas purificadas (ver Materiales y Métodos). En un primer ensayo identificamos que ambas proteínas se unen a un fragmento contenido entre las posiciones -255 y -6, pero no a fragmentos que contienen la secuencia corriente arriba o abajo de esta región (Fig. 33A y B). Para delimitar de manera más precisa el sitio de unión de IHF, realizamos EMSAs con los fragmentos contenidos en las fusiones *ecpR*-4, *ecpR*-9 y *ecpR*-10, y como control negativo el fragmento *ecpR*-14 (Tabla 4). Como se puede ver en la Fig. 33C, IHF se une muy bien al fragmento *ecpR*-4, y con aparente menor afinidad al fragmento *ecpR*-9, pero ya no se une al fragmento *ecpR*-10. Esto sugiere que IHF se une entre las posiciones -103 y -66, aunque queda por definir la secuencia exacta mediante experimentos tipo “footprinting”. Al hacer el mismo experimento, pero ahora con la proteína H-NS (Fig. 33D), observamos que ésta se une a los tres fragmentos, aunque aparentemente con menor afinidad al fragmento *ecpR*-10.

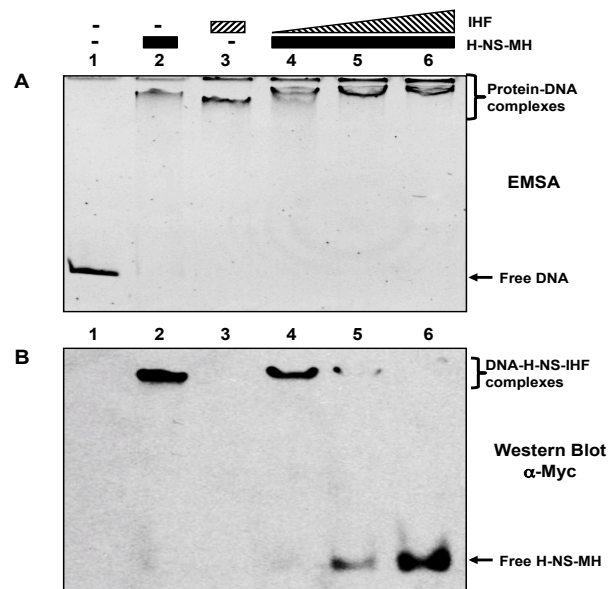
Estos resultados sugieren que ambas proteínas se unen entre las posiciones -106 y -66, aunque no descartan que pueda haber otros sitios de unión de menor afinidad.



**Fig. 33.** IHF y H-NS se unen a la región reguladora del operón *ecp*. **A)** EMSA con el fragmento *ecpR*-1 (líneas punteadas) digerido con *DraI* con concentraciones crecientes de IHF (40, 60, 80 y 100 nM). **B)** EMSA con el fragmento *ecpR*-1 digerido con *DraI* con concentraciones crecientes de H-NS (25, 50, 75, 100, 125 y 150 nM). **C)** EMSA con los fragmentos *ecpR*-4, *ecpR*-9, *ecpR*-10 y *ecpR*-14 con 60 y 100 nM de IHF. **D)** EMSA con los mismos fragmentos que en C) pero con 200 y 400 nM de H-NS.

## 6.12 IHF desplaza a H-NS

En su conjunto los datos descritos anteriormente sugieren que la interacción de IHF con la región reguladora podría desplazar o impedir la unión de H-NS para evitar la represión. Para analizar la posibilidad de que IHF desplace a H-NS, se realizó un EMSA competitivo utilizando el fragmento *ecpR*-4 y ambas proteínas purificadas. Para esto se incubó al fragmento primero con H-NS a una sola concentración para preformar el complejo y posteriormente se añadió IHF en concentraciones crecientes, el resultado se muestra en la Fig. 34A. Como se puede observar, al incubarlo con 400 nM de H-NS se forma un complejo proteína-DNA que migra poco con respecto a la entrada del pozo del gel (carril 2), mientras que un complejo que migra ligeramente más rápido se observa cuando se incubó al fragmento con 100 nM de IHF (carril 3). Cuando se preforma el complejo primero con 400 nM de H-NS y luego se añaden 100, 200 y 300 nM de IHF (carriles 4, 5, y 6) se observa que el complejo proteína-DNA migra más lentamente. Esto podría interpretarse como que ambas proteínas se encuentran formando el complejo, sin embargo, al detectar a H-NS por “western blot” (Fig. 34B), se observa que IHF va desplazando a H-NS hasta que ésta se vuelve imperceptible mediante esta técnica (carril 6), lo cual apoya la hipótesis que plantea que IHF se requiere para eliminar la represión que ejerce H-NS.



**Fig. 34.** IHF desplaza a H-NS. **A)** EMSA con el fragmento *ecpR*-4 incubado con 400 nM de H-NS-MycHis (carriles 2, 4, 5 y 6) y concentraciones crecientes de IHF (carril 3: 100 nM, carril 4: 100 nM, carril 5: 200 nM y carril 6: 300 nM). **B)** “Western blot” de A con anti-Myc.

---

---

## 7. DISCUSIÓN

Además de estar conservado en cepas patógenas y comensales de *E. coli*, el operón *ecp* tiene ortólogos en otras bacterias patógenas de los géneros *Klebsiella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Yersinia* y *Citrobacter*. El porcentaje de identidad entre las subunidades principales es de más del 98% entre las cepas de *E. coli*. Con respecto a *Klebsiella*, el operón está conservado en su totalidad y mantiene la organización presente en *E. coli*, mientras que en el caso de *Shigella* se conservan únicamente los tres primeros genes, lo cual podría sugerir que probablemente esta cepa no expresa las fimbrias (Fig. 8). En *Citrobacter rodentium* se conserva la organización de los genes *ecpABCDE*; sin embargo, en este caso el gen *ecpR* no se encuentra al principio del operón como en *E. coli*, sino que se encuentra en dirección opuesta al operón, corriente abajo del gen ROD-29251, el cual a su vez se encuentra corriente abajo de *ecpE*.

A la fecha existen varios reportes sobre ECP, los cuales se han enfocado en analizar su distribución, contribución a la adherencia y en la formación de biopelículas (Avelino et al, 2010; Blackburn et al, 2009; Hernandez et al, 2011; Lasaro et al, 2009; Lehti et al, 2010; Rendon et al, 2007; Saldana et al, 2009; Scaletsky et al, 2010); sin embargo, su regulación recién ha comenzado a estudiarse. Se sabe que en la regulación de los operones fimbriales están involucrados no sólo reguladores globales, sino también reguladores codificados en el mismo operón, como en el caso de los operones *fim* y *pap*, donde existen dos reguladores codificados al inicio de cada operón que regulan de manera positiva y negativa la expresión de los genes corriente abajo (Blomfield, 2001). Las proteínas reguladoras codificadas en operones fimbriales son muy diversas, algunas son recombinasas (FimB y FimE) y otras son reguladores transcripcionales pertenecientes a varias familias, entre ellas: AraC (ej. PerA, AggR y Rns), FaeA (PapI) y PapB.

El objetivo de este trabajo fue analizar la regulación transcripcional del operón *ecp*, así como determinar el papel de EcpR. Los primeros resultados muestran que en EPEC el operón se transcribe a partir de dos promotores, mientras que en EHEC sólo se detecta uno. Al parecer esta diferencia se debe a que el P2 depende de un factor que se encuentra sólo en EPEC, ya que en EHEC no se detecta este promotor aun cuando se utilicen fusiones de EPEC. Algo similar ocurre en el caso de NMEC, donde se detectan 3

---

---

promotores (Lehti et al, 2012a), aun cuando su secuencia es 99% idéntica a las de EPEC y EHEC, lo cual sugiere que la expresión de *ecp* depende también de reguladores específicos de cada patotipo. Alternativamente, no podemos descartar que el producto del supuesto promotor P2 identificado en EPEC se deba en realidad al procesamiento del transcrito proveniente del P1 y que este mensajero sea procesado de manera diferencial en cada cepa.

A diferencia de los operones *fim* y *pap*, en el caso de *ecp* sólo hay un regulador codificado en el operón. En este trabajo vimos que, de manera similar a lo que ocurre en otros operones fimbriales, los genes que forman el cluster *ecp* son transcritos como un operón y que el producto del primer gen, EcpR, actúa como regulador positivo. El papel de EcpR fue analizado mediante el uso de fusiones transcripcionales, así como a través de la detección de la subunidad principal de la fimbria EcpA por “western blot” o de la presencia de la fimbria en la superficie bacteriana por citometría de flujo. Aunque el efecto de la mutación en *ecpR* en la expresión de las fusiones de *ecp* es moderado, la sobre expresión de EcpR permitió analizar su función como regulador positivo del operón. Este efecto moderado puede deberse a que las condiciones de crecimiento utilizadas en este trabajo no son las óptimas para inducir en toda su capacidad al promotor *ecp*. Sin embargo, el efecto de la mutación en *ecpR* fue más evidente por “western blot” y citometría de flujo, ya que en la cepa mutante la expresión de la proteína EcpA y la presencia de la fimbria en la superficie bacteriana se redujeron significativamente. Creemos que este efecto puede deberse a un mecanismo regulador adicional que pudiera estar controlando los niveles de transcripción de los genes corriente abajo de *ecpR* o su traducción y que son contrarrestados cuando EcpR es sobre expresado y, por lo tanto, se aumenta la expresión de todo el operón. En este sentido, datos preliminares sugieren que entre los genes *ecpR* y *ecpA* existe una secuencia tipo atenuador, ya que la actividad de fusiones que no contienen la región intergénica es mayor con respecto a fusiones que sí la contienen (Fig. 37, Capítulo II) (Lehti et al, 2012b). Sin embargo, este mecanismo tiene aun que estudiarse en más detalle.

EcpR contiene un motivo HTH de unión a DNA característico de proteínas de la familia LuxR, lo cual podría agruparla como miembro de esta familia; sin embargo, su extremo N-terminal no posee un dominio de unión a autoinductor, ni similitud con proteínas de “quorum sensing”. La superfamilia LuxR está formada no solamente por

---

---

proteínas de “quorum sensing”, sino también por reguladores de sistemas de dos componentes, proteínas que unen múltiples ligandos y proteínas con dominios efectores autónomos. A pesar de que EcpR posee varios residuos en el extremo C-terminal que están conservados entre reguladores de respuesta de la subfamilia NarL/FixJ, así como un probable residuo fosfoceptor (D60), carece de varios de los residuos N-terminal claves de los dominios receptores. Consistente con esta observación, la mutante EcpR D60A no está afectada en su habilidad de activar la expresión del promotor de *ecp* o de inducir la síntesis de EcpA. En contraste, el residuo correspondiente en el regulador de respuesta a nitrato NarL (D59) es esencial para esta actividad (Egan & Stewart, 1991).

Todas estas proteínas, a pesar de poseer extremos N-terminal distintos, poseen un dominio HTH similar al de la proteína LuxR, a partir de la cual se nombró a la familia. Otra característica en común es que las proteínas de esta familia actúan como activadores o represores clásicos uniéndose a regiones corriente arriba o sobre el promotor, respectivamente (Egland & Greenberg, 1999; Galinier et al, 1994; Ichikawa et al, 1999). En el caso de EcpR vimos que no actúa como un activador clásico, ya que sus dos sitios de unión, las cajas TTCCT, se localizan entre las posiciones -185 y -189 y -207 y -211, con respecto al sitio de inicio de la transcripción. De acuerdo con esto, fusiones que no contienen el sitio de unión identificado son activas en ausencia de EcpR. La gran distancia que hay entre el sitio de unión de EcpR y el promotor, así como el hecho de que, al parecer, EcpR requiere de IHF para ejercer su función, nos llevó a pensar que EcpR pudiera estar actuando como una “enhancer binding protein” (EBP) junto con sigma 54. Sin embargo, al analizar la capacidad de EcpR de activar a la fusión *ecpR-4* en una mutante en *rpoN*, vimos que la mutación no afecta la actividad de EcpR (datos no mostrados). La función de EcpR parece ser más bien la de un desrepresor, ya que vimos que en ausencia de H-NS la expresión del promotor *ecp* se incrementa a niveles similares a los alcanzados cuando se sobre expresa a EcpR, y que dicha actividad en la mutante de *hns* no aumenta de manera significativa aun en presencia de EcpR. Este es un papel novedoso para un miembro de la familia LuxR, ya que a la fecha no se han descrito proteínas que actúen como desrepresores.

Otra de las características que diferencia a EcpR de las proteínas de la familia LuxR es la secuencia blanco. Varios reportes indican que las proteínas de esta familia reconocen secuencias invertidas repetidas que varían entre 7 y 20 pb (Darwin et al, 1997; Egland &

---

---

Greenberg, 1999; Fuqua & Winans, 1996; Hwang et al, 1994). Este no es el caso de EcpR, ya que la región identificada como esencial para la activación mediada por este regulador son dos secuencias repetidas directas de 5 pb (cajas TTCCT), las cuales están separadas entre sí por una región espaciadora de 17 pb. Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre con LuxR, EcpR parece no ser una proteína modular. Mientras que el extremo C-terminal de LuxR es capaz de unir DNA por sí solo, versiones truncas de EcpR son incapaces de activar la expresión de EcpA o de unir DNA *in vitro* (Fig. 24 y datos no mostrados).

En este trabajo se identificó que IHF también regula de manera positiva la expresión de *ecp*. Al parecer, junto con EcpR, ambas proteínas lo hacen eliminando la represión que ejerce H-NS, ya que en ausencia de H-NS ya no se requiere de ninguna de estas proteínas. La eliminación por IHF de la represión ejercida por H-NS concuerda con el hecho de que tanto IHF como H-NS tienen mayor afinidad por el mismo fragmento de DNA, el cual contiene un sitio consenso de unión de IHF. La función de IHF no sólo es la de quitar la represión ejercida por H-NS, sino que también es necesaria para la actividad de EcpR, ya que en ausencia de la primera, la segunda no puede activar la expresión del operón. El mecanismo detrás de esto se desconoce; sin embargo, resultados preliminares indican que EcpR es capaz de unirse al DNA en ausencia de IHF, lo cual sugiere que probablemente el papel de IHF sea doblar al DNA, generando un cambio en la topología local del DNA que permite el desplazamiento inicial de H-NS y el acercamiento del sitio de unión de EcpR a la región promotora para desplazar más eficientemente a las moléculas de H-NS unidas en la vecindad del promotor. Sin embargo, se necesitan más experimentos para dilucidar en detalle este mecanismo. A este respecto, se ha visto que estos reguladores también están involucrados en la regulación de las fimbrias tipo I. En el caso de IHF, ésta es necesaria para la inversión de un fragmento de 314 pb que contiene la región promotora, probablemente facilitando la adopción de una conformación favorable para su recombinación (Blomfield *et al.*, 1997); mientras que H-NS inhibe la inversión del promotor además de regular negativamente la expresión de *fimB*, la invertasa responsable de cambiar de la fase “off” a la “on” (O’Gara & Dorman, 2000; Olsen & Klemm, 1994). Además de estos reguladores globales, el regulador de respuesta RcsB también influencia la expresión de *ecp* en NMEC (Lehti et al, 2012b). RcsB regula de manera positiva la expresión de *ecp* uniéndose a una caja RcsB que sobrelapa con la caja TTCCT distal de EcpR. Al parecer, la actividad de EcpR depende de RcsB, ya que en una



---

---

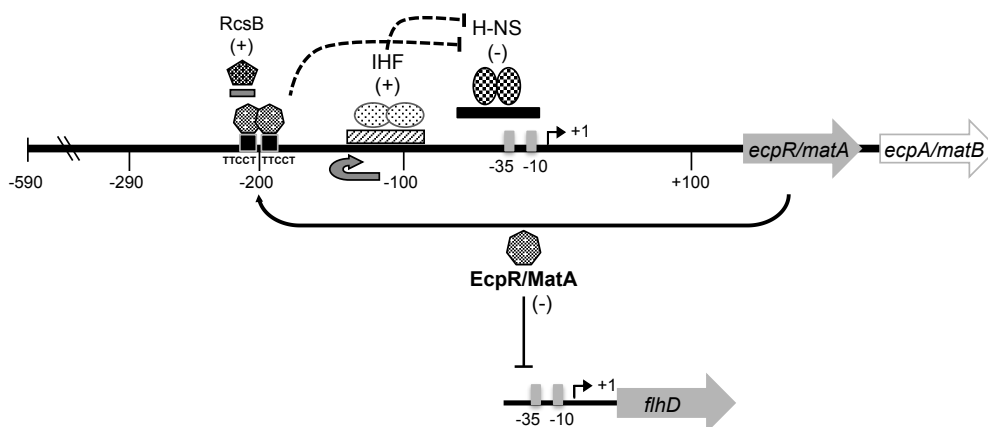
mutante en *rcsB*, EcpR no aumenta la expresión de *ecp*. Sin embargo, en este trabajo vimos que si se muta la caja RcsB sin afectar la caja TTCCT distal, la actividad de EcpR no se afecta. Se necesitan más experimentos para dilucidar la interacción entre estas proteínas en otras cepas de *E. coli* o si es una variación del mecanismo de regulación del operón *ecp* que sólo está presente en algunas cepas a pesar de que RcsB está ampliamente conservada.

---

---

## 8. CONCLUSIONES

Basados en los resultados obtenidos, proponemos un modelo de la regulación del operón *ecp* (Fig. 35). *ecpR* codifica para EcpR, la cual regula de manera positiva la expresión de *ecp* uniéndose a dos secuencias TTCCT repetidas directas, localizadas entre las posiciones -185 y -189 y -207 y -211, con respecto al sitio de inicio de la transcripción. Los reguladores globales IHF y H-NS actúan como reguladores positivos y negativo, respectivamente, mientras que el regulador de respuesta RcsB parece también actuar como regulador positivo. H-NS actúa alrededor de la región promotora, mientras que IHF lo hace alrededor de la posición -100. IHF, junto con EcpR, eliminan la represión ejercida por H-NS. Adicionalmente, EcpR regula de manera negativa la expresión de *flhD*, sugiriendo que podría regular otros genes tanto de forma negativa como positiva.



**Fig. 35.** Modelo propuesto de la regulación del operón *ecp*. *ecpR* codifica para EcpR, una proteína reguladora que contiene un dominio HTH de unión a DNA tipo LuxR, la cual regula de manera positiva la expresión del operón *ecp* uniéndose a dos cajas TTCCT localizadas distantemente en las posiciones -211 a -207 (caja distal) y -189 a -185 (caja proximal) con respecto al sitio de inicio de la transcripción. Junto con IHF, la cual al parecer dobla al DNA entre las cajas TTCCT y el promotor para acercar a EcpR a éste, contrarresta la represión ejercida por H-NS en el promotor *ecp*. Además, el regulador de respuesta RcsB también regula de manera positiva al promotor *ecp* uniéndose a una secuencia que sobrelapa con la caja TTCCT distal. EcpR también actúa como regulador negativo reprimiendo la expresión del operón flagelar maestro *flhDC*.

---

---

## 9. PERSPECTIVAS

- Identificar el sitio de unión de IHF mediante un ensayo de protección a DNAsa I.
- Corroborar el sitio de unión mediante mutagénesis sitio-dirigida.
- Determinar el mecanismo de acción de IHF mediante experimentos de permutación del sitio de unión, recortes de la región reguladora para acercar las cajas TTCCT al promotor, generar eliminaciones para desfasar el sitio de unión de EcpR con respecto al promotor.
- Determinar si EcpR dimeriza mediante experimentos de “pull down” y el uso del sistema LexA.
- Identificar al regulador que se une en la secuencia repetida invertida mediante mutagénesis al azar.

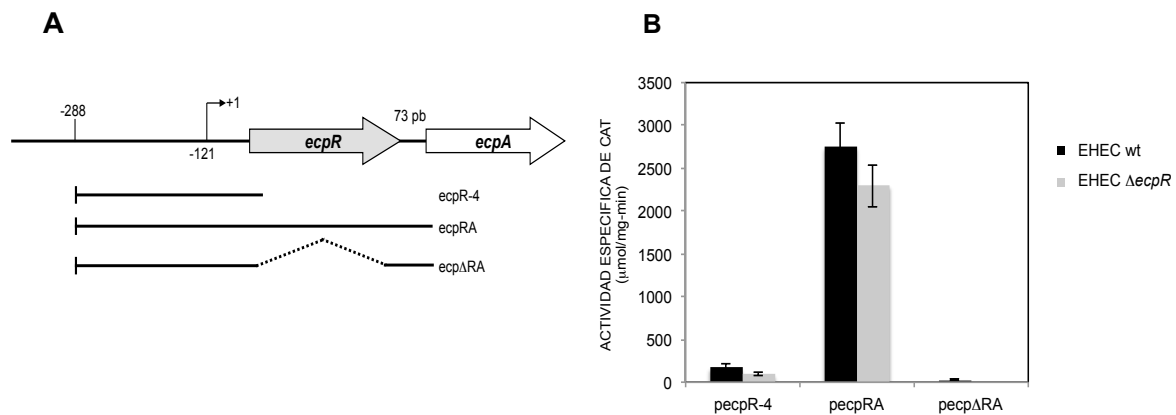
### 10. IDENTIFICACIÓN DE UN ELEMENTO ATENUADOR EN LA REGIÓN INTERGÉNICA ENTRE *ecpR* y *ecpA*

La expresión de fimbrias por bacterias tiene un papel esencial en el proceso de patogénesis, ya que su expresión lleva al proceso de infección, lo que permite a las bacterias adherirse a las células epiteliales del hospedero o formar biopelículas. Su expresión puede ser controlada a nivel transcripcional y post-transcripcional. La regulación transcripcional incluye mecanismos reguladores clásicos que involucran activadores y represores. Si estos reguladores son globales o locales, así como qué señales ambientales afectan la expresión, varía dependiendo del operón fimbrial, y muchos son controlados por múltiples factores. Una característica común de muchas de estas estructuras es la organización de los genes que los codifican en operones policistrónicos. Estos operones determinan la producción de una subunidad mayor, algunas subunidades menores y otras proteínas involucradas en el proceso de ensamblaje. Las subunidades mayores de las diferentes fimbrias son expresadas a niveles marcadamente mayores que el resto de las proteínas, por lo que la regulación post-transcripcional de la expresión fimbrial resulta en la expresión diferencial de los genes dentro de un operón y se cree que asegura las cantidades relativas correctas de las diferentes proteínas (Nilsson et al, 1996). Se han sugerido varios mecanismos que llevan a la expresión diferencial de los genes fimbriales, entre los cuales se encuentran la estabilidad diferencial del mRNA, procesamiento del mismo, terminación parcial y atenuación (Baga et al, 1988; Bilge et al, 1993; Jordi et al, 1993; Nilsson & Uhlin, 1991).

#### 10.1 La región intergénica contiene un elemento atenuador

Con el fin de identificar elementos reguladores en la región estructural de *EcpR*, se construyó una fusión que abarca desde la posición -288, con respecto al sitio de inicio de la transcripción de *ecpR*, hasta la posición +22 con respecto al codón de inicio de *ecpA* (*pecpRA*, Tabla 4). Así mismo, para evitar el efecto de la autorregulación de *EcpR*, se

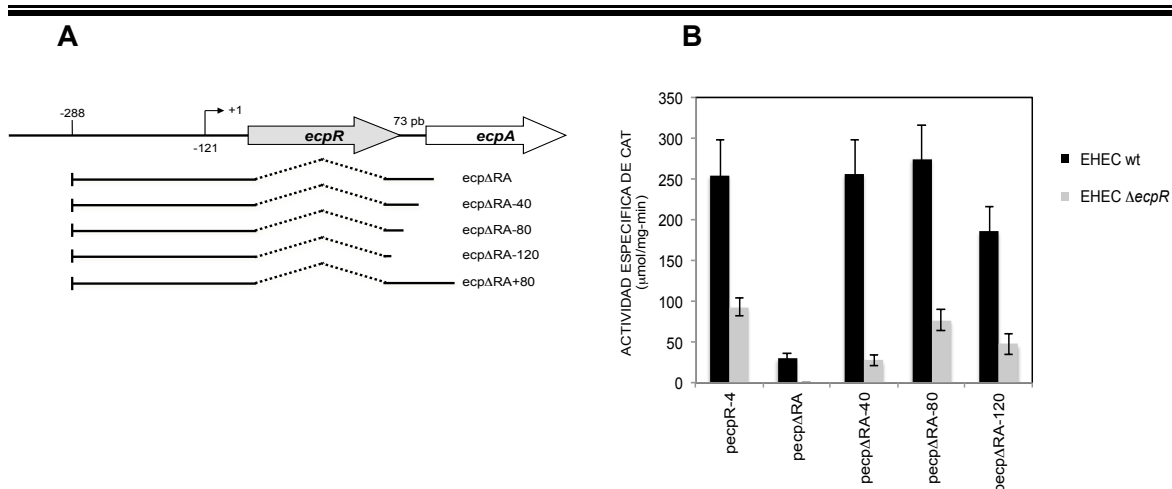
construyó una fusión similar pero que no posee la mayor parte de la región codificante de *ecpR* (*pecpΔRA*, Tabla 4). Ambas fusiones contienen el mismo límite hacia el extremo 5' que la fusión *ecpR-4* (Fig. 36A). Al analizar la expresión de estas fusiones (Fig. 36B), se observó que la expresión de la fusión *ecpRA* es aproximadamente 15 veces mayor que la de la fusión *ecpR-4*, lo cual se debe a que la primera sobreexpresa a *EcpR* y ésta a su vez aumenta la expresión de la fusión. En cambio, la expresión de la fusión *ecpΔRA* disminuye aproximadamente 7 veces con respecto a la de la fusión *ecpR-4*. Este resultado sugiere que en la región intergénica existe un elemento involucrado en regulación negativa que disminuye la transcripción hacia *ecpA*.



**Fig. 36.** Identificación de un elemento atenuador en la región intergénica. **A)** Representación esquemática de la región reguladora de *ecp*. La región intergénica entre *ecpR* y *ecpA* es de 73 pb. La flecha negra indica el sitio de inicio de la transcripción localizado a 121 pb corriente arriba del codón de inicio. Las líneas punteadas indican la región estructural de *ecpR* eliminada. **B)** Ensayo de actividad de CAT con las cepas de EHEC EDL933 silvestre y  $\Delta*ecpR*$  transformadas con las fusiones *ecpR-400*, *ecpRA* y *ecpΔRA* crecidas en medio DME a 37°C en agitación por 6 hr.

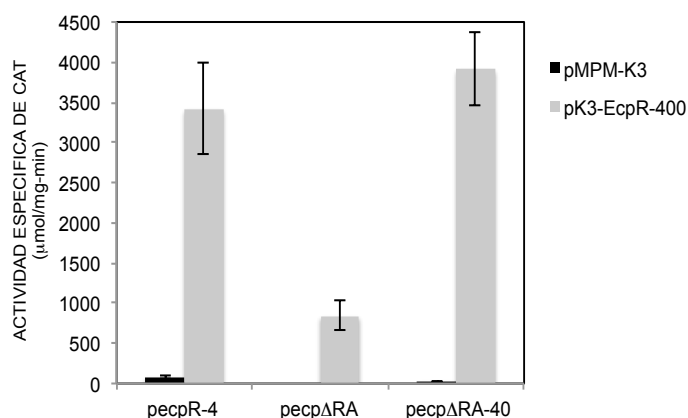
## 10.2 Recortes de la región intergénica eliminan el efecto atenuador

Para corroborar esta hipótesis, se construyeron 3 fusiones similares a la fusión *ecpΔRA*, pero que contienen recortes consecutivos de 40 pb del extremo 3' (Tabla 4). Estas fusiones fueron nombradas *ecpΔRA-40*, *ecpΔRA-80* y *ecpΔRA-120*, respectivamente (Fig. 37A y Fig. 39B).



**Fig. 37.** Recortes de la región intergénica eliminan el efecto atenuador. **A)** Representación esquemática de las fusiones *ecpΔRA*, *ecpΔRA-40*, *ecpΔRA-80*, *ecpΔRA-120* y *ecpΔRA+80*. Las líneas punteadas indican la región estructural de *ecpR* eliminada. **B)** Ensayo de actividad de CAT con las cepas de EHEC EDL933 silvestre y  $\Delta$ *ecpR* transformadas con las fusiones *ecpΔRA*, *ecpΔRA-40*, *ecpΔRA-80* y *ecpΔRA-120* crecidas en medio DME a 37°C en agitación por 6 hr.

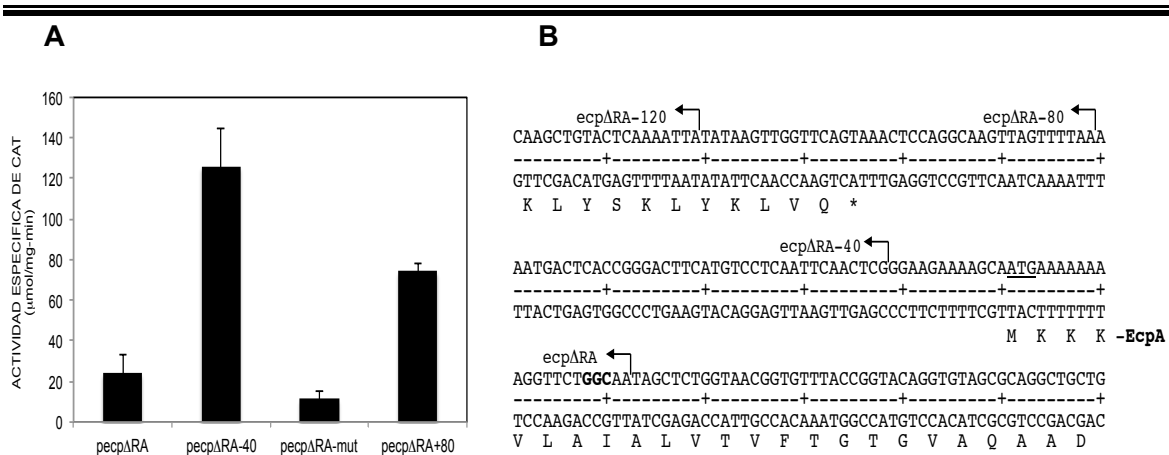
Como se puede ver en la Fig. 37B, en la cepa silvestre la fusión *ecpR-4* tiene una actividad de aproximadamente 250 unidades, mientras que la expresión de la fusión *ecpΔRA* es de aproximadamente 30 unidades, esto es 8 veces menos que la fusión *ecpR-4*. Por su parte, las fusiones *ecpΔRA-40*, *ecpΔRA-80* y *ecpΔRA-120* tienen una actividad similar a la de la fusión *ecpR-4*. Este resultado apoya la hipótesis de que en la región intergénica existe un elemento atenuador que disminuye la expresión hacia *ecpA*. Por otro lado, al analizar la expresión en la cepa  $\Delta$ *ecpR*, podemos ver que la actividad de todas las fusiones es menor comparada con las actividades obtenidas en la cepa silvestre, lo cual se debe al efecto de EcpR en la región reguladora y no a un efecto de EcpR en la región intergénica, ya que las fusiones que contienen los recortes de la región intergénica se comportan igual que la fusión *ecpR-4*. Este mismo efecto se observa cuando se complementa a la cepa  $\Delta$ *ecpR* que lleva a las fusiones con un plásmido que sobreexpresa a EcpR (Fig. 38).



**Fig. 38.** El efecto atenuador es independiente de EcpR. Ensayo de actividad de CAT con la cepa EDL933  $\Delta ecpR$  transformada con las fusiones *ecpR-4*, *ecpΔRA* y *ecpΔRA-40* y complementada con el vector pMPPM-K3 o el plásmido pK3-EcpR-400 crecidas en medio DME a 37°C en agitación por 6 hr. La gráfica es el resultado de 3 experimentos independientes por duplicado.

### 10.3 El efecto atenuador no se debe a la formación de una estructura secundaria

Con el fin de determinar si en esta región existe una estructura secundaria responsable de la atenuación de la expresión, se realizaron predicciones de la formación de estructuras secundarias. Se identificó una posible estructura secundaria que abarca la región estructural de *ecpA*. Para determinar si esta estructura es la responsable del efecto atenuador que observamos y si la eliminación de los 40 pb en la fusión *pecpΔRA-40* desestabiliza dicha estructura liberando el efecto atenuador, se introdujeron mutaciones que eliminan su formación en la fusión *pecpΔRA-mut*. De igual manera se construyó una fusión que lleva una porción más grande de la región estructural, la cual se llamó *ecpΔRA+80* (Fig. 39B). Al analizar la actividad de estas fusiones se observó que la fusión *ecpΔRA-mut* se expresa de manera similar a la fusión *ecpΔRA*, sugiriendo que la estructura secundaria identificada *in silico* no es responsable del efecto atenuador, mientras que la fusión *ecpΔRA+80* se expresa más que la fusión *ecpΔRA*, pero no alcanza los niveles de la fusión *ecpΔRA-40* (Fig. 39A).



**Fig. 39.** La eliminación de la estructura secundaria no aumenta la expresión. **A)** Ensayo de actividad de CAT con la cepa de EPEC E2348/69 silvestre transformada con las fusiones *ecpΔRA*, *ecpΔRA-40*, *ecpΔRA-mut* y *ecpΔRA+80* crecidas en medio DME a 37°C en agitación por 6 hr. **B)** Secuencia de la región intergénica entre *ecpR* y *ecpA*. Las flechas indican los extremos 3' de las fusiones. En negritas se indican las bases que se cambiaron en la fusión *ecpΔRA-mut*.

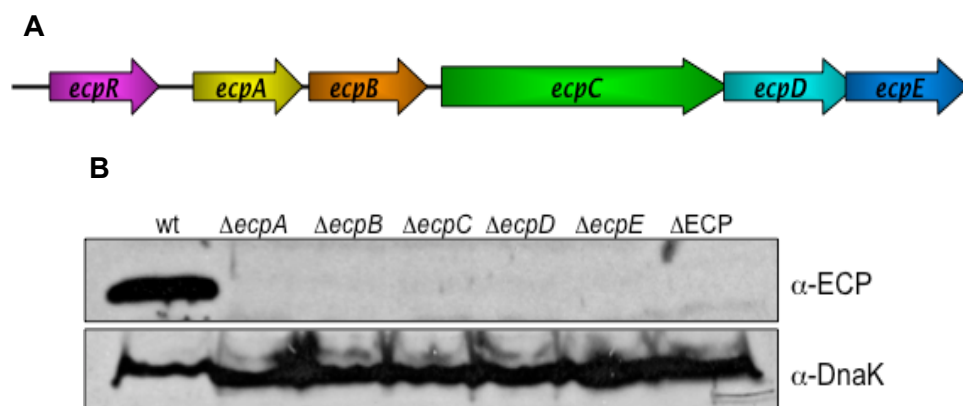
Estos resultados sugieren que el efecto atenuador que se observa en la fusión *ecpΔRA* no se debe a la formación de una estructura secundaria, ya que la eliminación de ésta no tiene efecto en la expresión. Por otro lado, el aumento en la expresión que se observa en la fusión *ecpΔRA+80* puede deberse a que al llevar una porción más grande de la región intergénica, haga más estable al mRNA y por lo tanto se observa una actividad más alta. Sin embargo, queda trabajo por hacer para definir si este efecto es real o un artificio generado en el contexto de la fusión transcripcional.



11. ANÁLISIS DE LA BIOGÉNESIS DE LA FIMBRIA ECP EN *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA

11.1 Todos los genes del operón son necesarios para la expresión de EcpA

Con el fin de empezar a dilucidar la función de los genes que forman el operón se construyeron mutantes no polares en cada uno de los genes. Estas cepas se analizaron por “western blot” para determinar si expresan o no a EcpA. Como se puede observar en la Fig. 40B, no se detecta expresión de EcpA en ninguna de las mutantes en *ecpB*, *ecpC*, *ecpD* y *ecpE* (Tabla 4). Como controles negativos se utilizaron las mutantes  $\Delta ecpA$  y  $\Delta ECP$ , ésta última tiene eliminados desde *ecpA* hasta *ecpE*, y como control positivo se utilizó a la cepa silvestre.



**Fig. 40.** Mutaciones en los genes *ecp* afectan la expresión de EcpA. **A)** Representación esquemática del operón *ecp*. **B)** “Western blot” con las cepas de EPEC E2348/69 silvestre,  $\Delta ecpA$ ,  $\Delta ecpB$ ,  $\Delta ecpC$ ,  $\Delta ecpD$ ,  $\Delta ecpE$  y  $\Delta ECP$ . crecidas en medio DME a 26°C en estático. La expresión de EcpA se detectó con anticuerpos anti-ECP. Como control de carga se detectó a DnaK.

El hecho de que las mutantes en *ecpB*, *C*, *D* y *E* no expresen a EcpA indica que los productos de todos los genes son necesarios para la síntesis y/o estabilidad de EcpA.

## 11.2 Las mutaciones introducidas no tienen un efecto polar sobre los genes corriente abajo

Para determinar que las mutaciones hechas no tuvieran un efecto polar sobre la expresión de los genes corriente abajo, se construyeron plásmidos que expresaran a las diferentes proteínas para complementar a las respectivas mutantes. Se clonó a cada uno de los genes de manera individual en el vector pBAD/MycHis A, quedando cada gen bajo el control del promotor de arabinosa y se generaron dos versiones: un plásmido que lleva al gen sin etiqueta y otro donde cada gen queda en fase con las etiquetas MycHis del vector (Tabla 4). De igual manera se clonaron diferentes combinaciones del operón en el vector pMPM-T6, generando tres plásmidos: pT6-ABC, pT6-CDE y pT6-DE (Tabla 4). Estos plásmidos se utilizaron para complementar a las mutantes correspondientes, las cuales se analizaron por “western blot” (datos no mostrados).

**Tabla 6.** Caracterización de los plásmidos utilizados para complementación y “pull down”.

PLÁSMIDO	INSERTO	Expresa la proteína?	Complementa?
pecpA-MH	ecpA	Sí expresa a EcpA-MH	Si
pecpA	ecpA	Sí expresa a EcpA	Si
pecpB-MH	ecpB	No	No
pecpB	ecpB	ND	No
pecpC-MH	ecpC	Sí expresa a EcpC-MH	Si
pecpC	ecpC	ND	Si
pecpD-MH	ecpD	Sí expresa a EcpD-MH	No
pecpD	ecpD	ND	Si
pecpE-MH	ecpE	Sí expresa a EcpE-MH	Si
pecpE	ecpE	ND	Si
pT6-ABC	ecpABC	ND	Si
pT6-CDE	ecpCDE	ND	Si
pT6-DE	ecpDE	ND	Si

ND: no determinado.

En todas las mutantes construidas se restauró la expresión de EcpA cuando fueron complementadas con los respectivos plásmidos, excepto en el caso de la mutante en *ecpB* con los plásmidos *pecpB* y *pecpB-MH* (Tabla 6). Sin embargo, sí se detectó expresión de EcpA en esta cepa cuando se complementó con el plásmido pT6-ABC. Estos resultados indican que las mutaciones de los genes *ecpA*, *ecpC*, *ecpD* y *ecpE* no tienen un efecto polar sobre los genes corriente abajo. En el caso de la mutante en *ecpB* aún queda por determinar si la falta de complementación con sus respectivos plásmidos

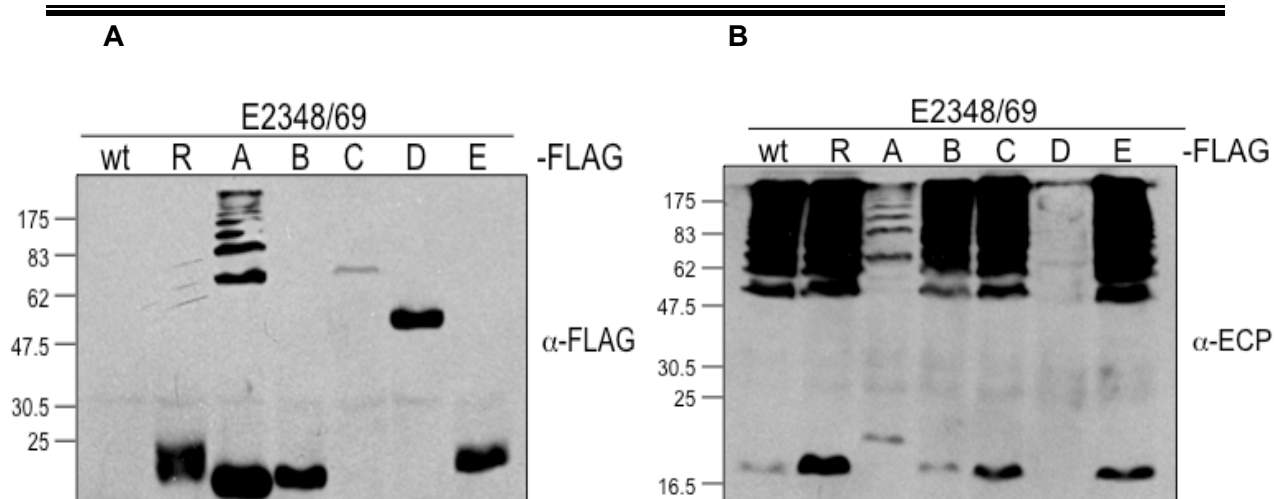
---

---

se debe a que éstos no expresan la proteína o a que esta mutación sí tiene polaridad sobre *ecpC*, como sugiere también la observación de que esta mutante se complementa con el plásmido pT6-ABC. De igual manera se analizó por “western blot” si los plásmidos expresan a sus respectivas proteínas (Tabla 6). En el caso de los plásmidos que expresan a las proteínas etiquetadas con Myc-His se observó que todas se expresan cuando se inducen con 0.2% de arabinosa, excepto en el caso del plásmido que codifica para EcpB-MH, donde no se pudo detectar a la proteína. En el caso de los plásmidos que expresan a las proteínas sin etiquetas no se pudo determinar si las expresan o no, ya que no contamos con anticuerpos contra ellas, excepto por EcpA. A pesar de que no pudimos detectar a estas proteínas, si vimos que son capaces de complementar a su respectiva mutante, lo cual indica que sí se están expresando y que son funcionales. La única construcción que no complementa es la que codifica para EcpD-MH, lo cual puede deberse a que la etiqueta en el C-terminal interfiere con su función, ya que el plásmido que expresa a EcpD sin etiqueta complementó sin problema.

### **11.3 Construcción de cepas etiquetadas**

Por similitud de secuencia, creemos que EcpB funciona como la chaperona de EcpA, mientras que EcpC es una proteína acomodadora y EcpE es la chaperona de EcpD, la cual tiene similitud con un receptor de *Vibrio cholerae*. Para analizar la interacción de estas proteínas entre ellas se realizaron experimentos de “pull down”, para lo cual se etiquetó a cada gen en el cromosoma con un triple epítoto FLAG en el extremo C-terminal. Antes de empezar a trabajar con las cepas resultantes, verificamos que la introducción de la etiqueta no alterara la función de las proteínas o la expresión de los genes corriente abajo mediante experimentos de “western blot”. Como se puede observar en la Fig. 41A, se detecta la expresión de todas las proteínas etiquetadas, excepto en la cepa silvestre, la cual no lleva ningún gen etiquetado.



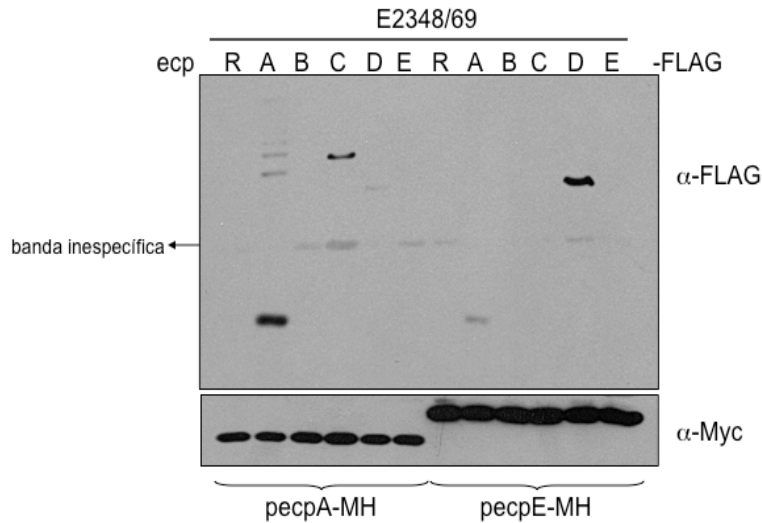
**Fig. 41.** Expresión de las proteínas etiquetadas. **A)** “Western blot” con la cepa de E2348/69 silvestre sin etiqueta, EcpR-FLAG, EcpA-FLAG, EcpB-FLAG, EcpC-FLAG, EcpD-FLAG y EcpE-FLAG revelado con un anticuerpo anti-FLAG. **B)** “Western blot” con las mismas cepas que en A) pero revelado con un anticuerpo anti-ECP.

Al hacer el “western blot” pero ahora usando el anticuerpo anti-ECP (Fig. 41B), podemos ver que todas las cepas, excepto la cepa que lleva a EcpD-FLAG, expresan a EcpA, lo cual indica que la introducción de las etiquetas no tiene un efecto polar sobre la expresión de los genes corriente abajo y tampoco afecta la función de las proteínas etiquetadas. En el caso de la cepa EcpD-FLAG, se observa lo mismo que se vio con el plásmido *pecpD-MH*, que al etiquetar a EcpD en el extremo C-terminal se afecta la función de la proteína generando un fenotipo similar al de la mutante en *ecpD* (Fig. 40B).

#### 11.4 EcpA-MH interactúa con EcpD-FLAG

Una vez teniendo las herramientas para trabajar, comenzamos por analizar la interacción de EcpA y EcpE con todas las proteínas codificadas por el operón *ecp* mediante experimentos de “pull down”. Esto se llevó a cabo con las cepas que expresan las diferentes proteínas Ecp con la etiqueta FLAG, a su vez transformadas con los plásmidos *pecpA-MH* y *pecpE-MH*. A partir de muestras de cultivos de estas cepas se prepararon extractos de donde se purificaron los complejos formados aprovechando la cola de histidinas presente en EcpA-MH o EcpD-MH, como se describe en Materiales y

Métodos. Como se puede observar en la Fig. 42, EcpA interacciona consigo misma, con EcpC y con EcpD, mientras que EcpE interacciona con EcpA y con EcpD.



**Fig. 42.** Interacción entre las proteínas Ecp. “Pull down” con las cepas de EPEC E2348/69 EcpR-FLAG, EcpA-FLAG, EcpB-FLAG, EcpC-FLAG, EcpD-FLAG, y EcpE-FLAG transformadas con los plásmidos pectA-MH y pectE-MH.

La interacción de EcpA consigo misma y con EcpC era de esperarse, ya que las subunidades tienen que interactuar entre ellas o con la proteína acomodadora para poder formar la fimbria. Lo que llamó la atención fue la interacción con EcpD, ya que esta proteína no tiene similitud con proteínas conocidas y se desconoce su función. Inesperadamente, no se detectó interacción de EcpA con las probables chaperonas EcpB y EcpE. Sin embargo, al analizar la interacción de EcpE-MH, sí se detecta interacción con EcpA y, aparentemente, con mayor afinidad con EcpD. Este resultado apoya la noción de que EcpE es chaperona de EcpD, y que también puede interactuar con EcpA. Apoyando la función de EcpE como chaperona, no se observa que interactúe consigo misma ni con EcpB. Curiosamente, tampoco interactúa con EcpC, como podría esperarse.

---

---

### 11.5 EcpD forma parte de la estructura de la fimbria

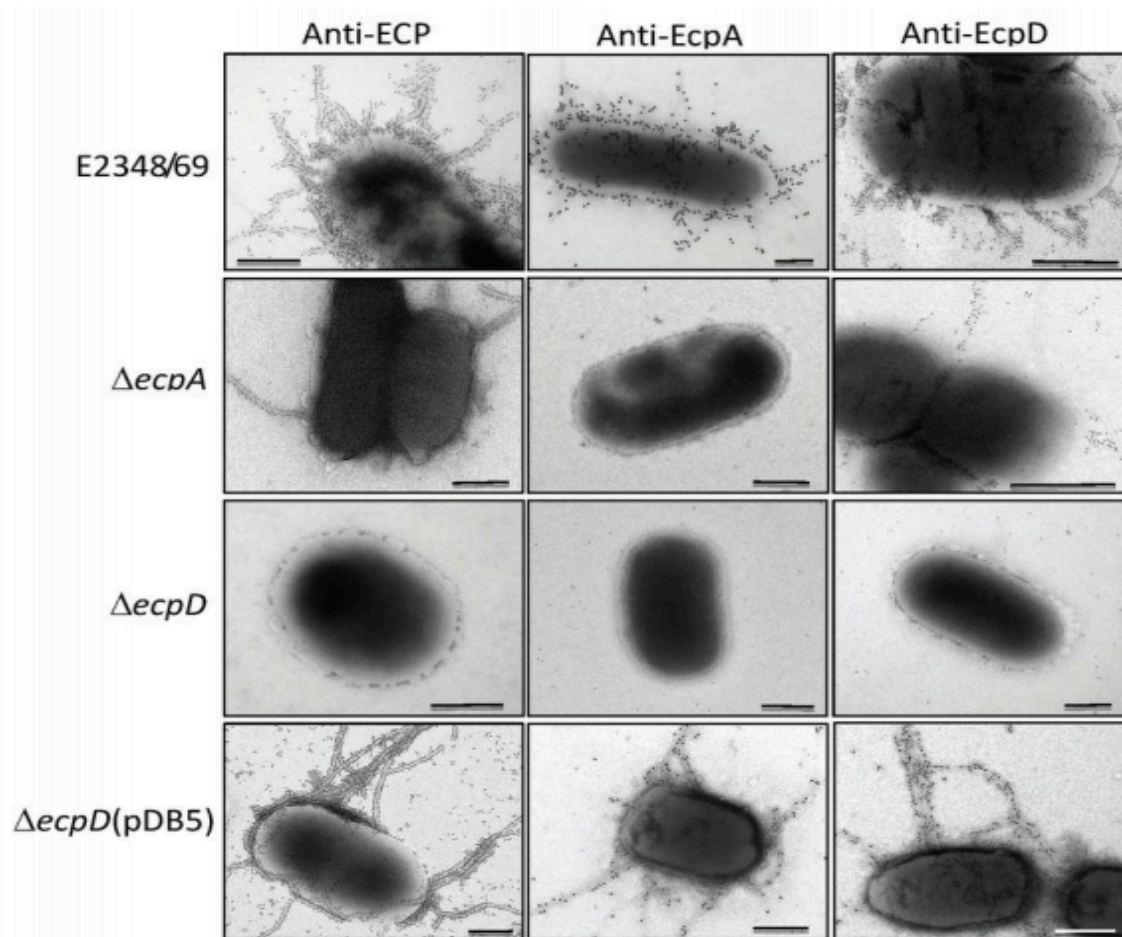
La interacción entre EcpA y EcpD y la similitud de ésta con un probable receptor de *Vibrio cholerae*, sugieren que probablemente EcpD forme parte de la estructura de la fimbria. Un alineamiento de las regiones Nte de ambas proteínas mostró un nivel significativo de similitud (Fig. 43), lo que sugiere que ambas proteínas pueden interactuar entre ellas, ya que como se mencionó en la introducción, estas secuencias median la interacción entre las subunidades mediante el proceso de intercambio de cadena donante.



**Fig. 43.** Homología entre el Nte de EcpA y EcpD. Los residuos altamente similares están coloreados de azul y los idénticos de rojo. La identidad entre las dos secuencias es de 53%. Se indican los probables residuos P1-P5 basados en la estructura de EcpA (Garnett et al, 2012).

Para determinar si esta interacción se da *in vivo*, se analizó la producción de ECP mediante la técnica de inmuno-oro (Fig. 44). Al utilizar el anticuerpo anti-ECP se observaron varias estructuras marcadas con oro alrededor de la bacteria. En el caso de la mutante en *ecpA*, se observaron sólo algunas estructuras marcadas. Siendo esta cepa mutante en la subunidad principal, estas estructuras deben estar formadas por otra proteína, probablemente EcpD. De acuerdo con esta hipótesis, en la mutante en *ecpD* no se detectan estructuras marcadas, mientras que en la mutante complementada se observan varias estructuras marcadas, parecido a lo que ocurre con la cepa silvestre. El anticuerpo anti-ECP utilizado se generó contra fimbrias completas purificadas, por lo que la detección de estructuras fimbriales en la mutante de *ecpA* sugiere que, como parte de la fimbria, se co-purifica otra proteína hacia la cual también se produjeron anticuerpos, por lo que el suero es capaz de reconocer a ambas proteínas. Para corroborar que las estructuras identificadas en la mutante en *ecpA* están formadas efectivamente por EcpD, se utilizaron otros dos anticuerpos dirigidos contra las proteínas EcpA y EcpD purificadas.

Con el anticuerpo anti-EcpA no se detectan estructuras marcadas ni en la mutante en *ecpA* ni en la mutante en *ecpD*, mientras que sí se detectan estructuras en la cepa silvestre y en la complementada. Con el anticuerpo anti-EcpD se detectaron estructuras marcadas en la mutante en *ecpA*, corroborando que éstas están formadas por EcpD. De igual manera, se detectan estructuras en la cepa silvestre y en la mutante complementada. Estos resultados sugieren que EcpD es capaz de formar estructuras en ausencia de EcpA, así como estructuras mixtas, aunque el papel de EcpD no está aún bien definido.



**Fig. 44.** Análisis de la producción de ECP en las cepas de EPEC E2348/69 silvestre,  $\Delta ecpA$ ,  $\Delta ecpD$  y  $\Delta ecpD/pDB5$  por microscopía immuno-electrónica. Las bacterias fueron incubadas con los anticuerpos primarios indicados y anticuerpos secundarios etiquetados con oro coloidal en rejillas de cobre cubiertas con Formvar y teñidas negativamente con ácido fosfotúngstico (barra = 500 nm).

---

---

## 11.6 Discusión

El operón *ecp* está formado por genes que codifican para proteínas que poseen similitud con proteínas fimbriales CFA/I, clasificadas como pertenecientes a la vía de ensamblaje chaperona-usher alterna. Aunque este operón conserva la organización característica de este tipo de operones, su composición es diferente, ya que es el único operón reportado que codifica para dos chaperonas. En los operones *pap* y *fim* la única chaperona interactúa con todas las subunidades y es la diferencia en afinidad de la proteína acomodadora por las subunidades lo que determina el orden en que éstas se van ensamblando. La presencia de dos chaperonas en el operón *ecp* nos llevó a pensar que probablemente cada chaperona interactúa con cada subunidad, sin embargo, los resultados del “pull down” muestran que EcpA no interactúa con su probable chaperona EcpB, mientras que sí se detecta que interactúa con EcpE, al igual que EcpD. El que no se detecte interacción de EcpA con EcpB podría deberse a la presencia de la etiqueta en el extremo C-terminal de la primera, la cual puede interferir en la interacción, sin embargo, aparentemente no afecta la interacción con EcpE. Aunque la cepa EcpA-FLAG es capaz de expresar a la proteína, no se ha analizado si sigue produciendo fimbrias. En el caso de EcpD, es más evidente que la etiqueta en el C-terminal le afecta, ya que la cepa EcpD-FLAG no expresa a EcpA y el plásmido EcpD-MH no es capaz de complementar. Sin embargo, por “pull down” sí se detecta interacción de EcpD con EcpA y con EcpE. Este resultado podría sugerir que el resultado del “pull down” es un artificio, sin embargo, la interacción entre EcpD y EcpA se demostró *in vivo* mediante microscopía.

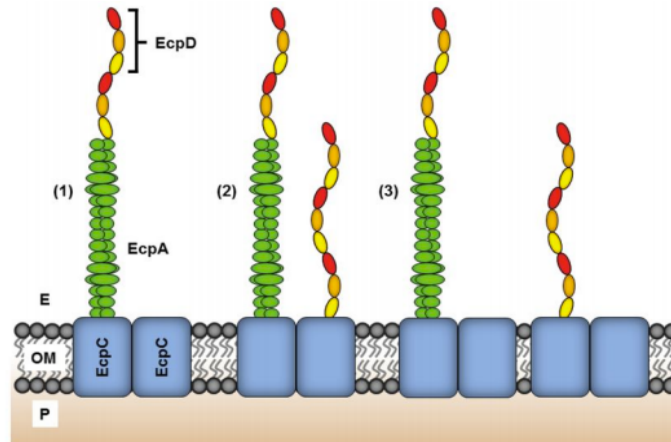
Originalmente, la única subunidad identificada como componente de ECP fue EcpA (Pouttu et al, 2001; Rendon et al, 2007). Mediante microscopía inmuno-electrónica detectamos la producción de fimbrias en una mutante en *ecpA*. Estas fimbrias no estaban formadas por EcpA pero eran reconocidas por el anticuerpo anti-ECP, esto puede deberse a que para generar este anticuerpo se utilizaron fimbrias completas, las cuales ahora sabemos que se encuentran formadas por EcpA pero tienen a EcpD en la punta. Utilizando un anticuerpo dirigido contra la proteína EcpD purificada, se detectaron estructuras formadas en su totalidad por EcpD. Esta proteína representa un nuevo tipo de adhesina, ya que posee un Nte que no está presente en otras adhesinas y el cual le permite polimerizar consigo misma y con EcpA, así como formar tanto estructuras independientes como mixtas. Basados en estos resultados, proponemos tres distintos



---

---

modelos para la producción de fibras ECP (Fig. 45). Parte de estos resultados están incluidos en el artículo que se presenta en el anexo I (Garnett et al, 2012).

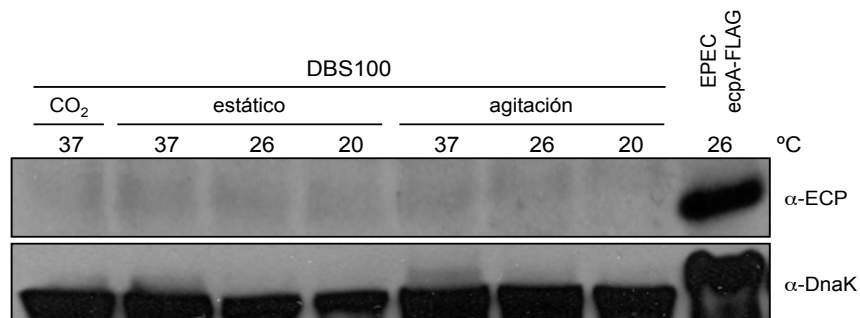


**Fig. 45.** Modelos de formación de fimbrias ECP. Modelo (1): una sola fibra es exportada a través de un solo poro del dímero EcpC. La fimbria está compuesta de EcpD polimerizada en la punta y un tallo formado por EcpA. Modelo (2): una fibra de ECP es co-secretada a través de un poro alterno del dímero EcpC junto con la fibra EcpD. Modelo (3): similar al modelo (2), aunque las dos fibras son exportadas a través de distintos dímeros de EcpC.

12. ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL OPERÓN *ecp* EN *Citrobacter rodentium*

12.1 El anticuerpo anti-ECP de EHEC no reconoce a EcpA de *C. rodentium*

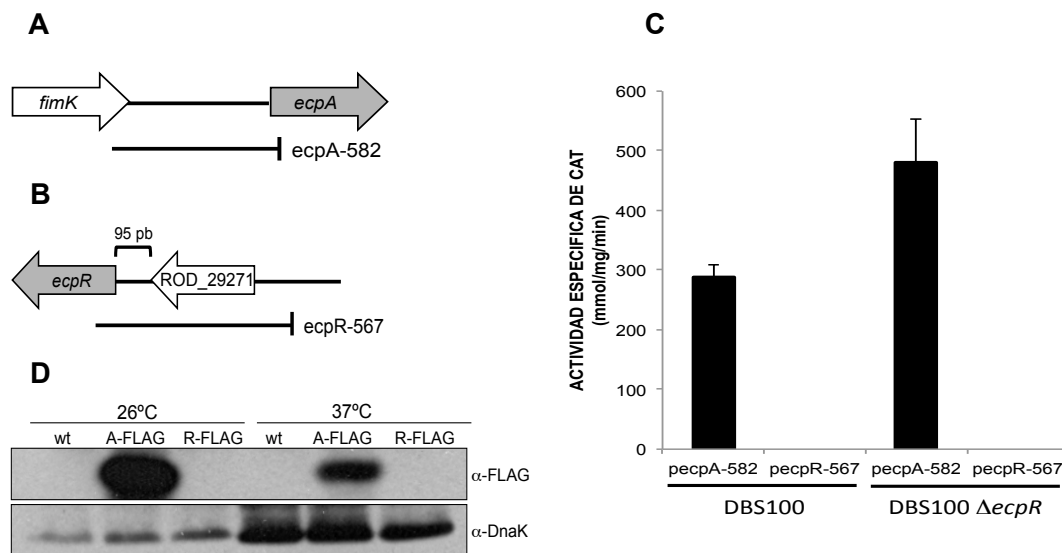
Como se mencionó en la introducción, las proteínas EcpA de EHEC y de *C. rodentium* comparten el 48% de identidad. Con el fin de determinar si el anticuerpo anti-ECP, generado contra las fimbrias de EHEC, reconoce a la proteína de *C. rodentium*, se realizó un “western blot” con la cepa de *C. rodentium* DBS100 crecida en diferentes condiciones. Como se muestra en la Fig. 46, el anticuerpo anti-ECP de EHEC no reconoce a la proteína EcpA de *C. rodentium* en ninguna condición, mientras que sí detecta a la proteína de EPEC. Este resultado sugiere que, aunque las proteínas son ortólogas, la identidad no es suficiente para que la proteína de *Citrobacter* pueda ser reconocida por los anticuerpos generados contra la proteína de EHEC. Sin embargo, tampoco se puede descartar la posibilidad de que el operón de *C. rodentium* sea inactivo y sea ésta la razón por la que no se detectó la proteína.



**Fig. 46.** El anticuerpo de EHEC no reconoce a la proteína de *C. rodentium*. “Western blot” con extractos totales de la cepa DBS100 crecida en medio DME en diferentes condiciones. Como control positivo se utilizó extracto total de la cepa E2348/69 *ecpA*::FLAG. DnaK se detectó como control de carga.

## 12.2 *C. rodentium* expresa a EcpA pero no a EcpR

Para determinar si las proteínas EcpR y EcpA se expresan y, a su vez, se puedan detectar por “western blot”, se etiquetaron a los respectivos genes con un triple epítopo FLAG, como se mencionó en Materiales y Métodos. Las cepas resultantes se crecieron en medio DME a 26°C y 37°C en condiciones estáticas para determinar si los genes se expresan en las mismas condiciones que en EPEC y EHEC. Como se observa en la Fig. 47D, EcpA-FLAG se detecta en ambas condiciones y la expresión de esta proteína es mayor a 26°C que a 37°C, similar a lo que ocurre en EPEC y EHEC. En el caso de EcpR, no se detectó expresión en ninguna condición. La falta de expresión de EcpR también se observó por ensayo de actividad de CAT con una fusión transcripcional que contiene toda la región estructural del gen ROD\_29271 y 116 pb de secuencia adicional contemplando la inclusión de un posible promotor que pudiera controlar la expresión de ambos genes si éstos estuvieran organizados como un operón (Fig. 47B). En este ensayo se observa que, en la cepa DBS100 silvestre, la fusión *ecpA*-582 sí es activa y presenta una actividad de aproximadamente 300 unidades, mientras que la fusión *ecpR*-567 no muestra actividad (Fig. 47C). Al analizar la actividad de las fusiones en la cepa mutante en *ecpR* se observa que la fusión *ecpR*-567 tampoco muestra actividad, mientras que hay un ligero incremento en la actividad de la fusión *ecpA*-582.

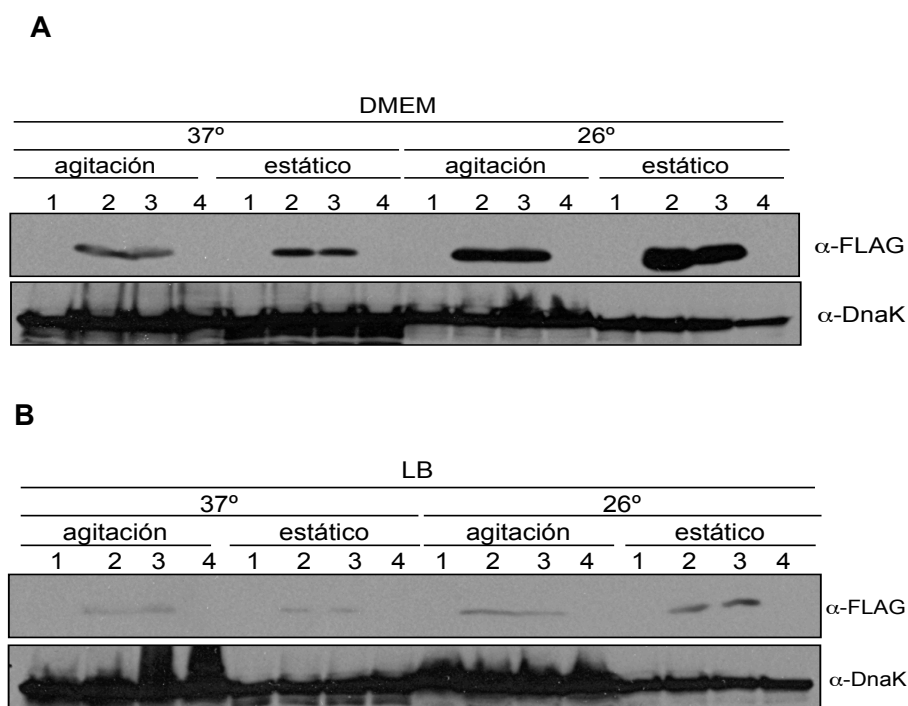


**Fig. 47.** Expresión de EcpA y EcpR. **A y B)** Representaciones esquemáticas de las fusiones *ecpA*-582 (A) y *ecpR*-567 (B). **C)** Ensayo de actividad de CAT con las cepas DBS100 silvestre y  $\Delta$ *ecpR*

transformadas con las fusiones *ecpA*-582 y *ecpR*-567 crecidas en medio DME a 26°C en estático. **D)** “Western blot” con las cepas DBS100 silvestre, EcpA-FLAG y EcpR-FLAG crecidas en medio DME a 26°C ó 37°C en estático. EcpA y EcpR fueron detectadas con anti-FLAG. DnaK fue detectada como control de carga.

### 12.3 EcpR no regula la expresión de EcpA

Con el fin de identificar alguna condición donde se detecte expresión de *ecpR*, se realizó un experimento de “western blot” con las cepas DBS100 silvestre, EcpA-FLAG, EcpR-FLAG y  $\Delta$ *ecpR*/EcpA-FLAG crecidas en medio LB o DME a 26°C ó 37°C en agitación o estático. Como se puede observar en la Fig. 48, no se detecta expresión de EcpR-FLAG en ninguna de las condiciones probadas, lo cual sugiere que probablemente este gen no es funcional. De acuerdo con este resultado, tampoco se observa ningún cambio en la expresión de EcpA-FLAG en la cepa mutante en *ecpR* con respecto a la cepa silvestre.

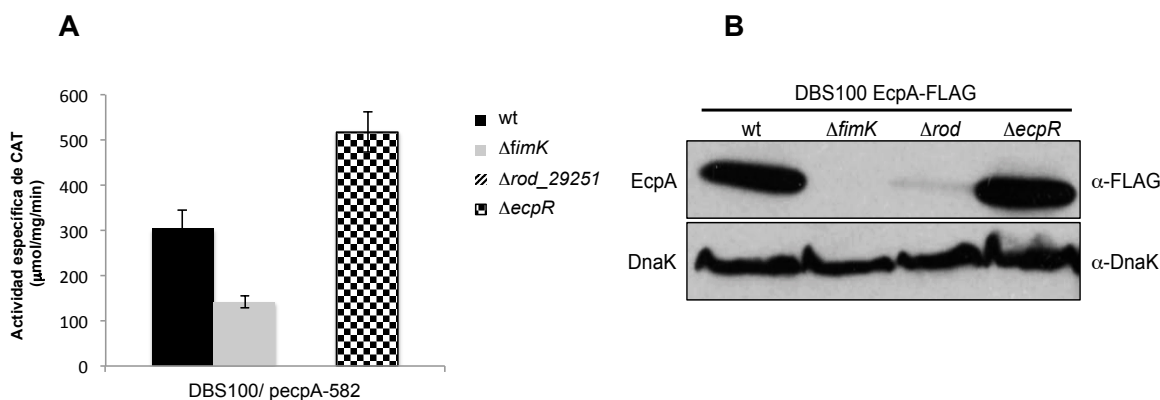


**Fig. 48.** EcpR no se expresa en *C. rodentium*. “Western blot” con las cepas DBS100 silvestre (carril 1), EcpA-FLAG (carril 2),  $\Delta$ *ecpR*/EcpA-FLAG (carril 3) y EcpR-FLAG (carril 4) crecidas en medio DME (**A**) o LB (**B**) a 37°C ó 26°C en agitación o estático. EcpR y EcpA fueron detectadas con anti-FLAG. DnaK fue detectada como control de carga.

Aunque no se detectó expresión de EcpR en ninguna condición, este resultado nos permitió determinar que, de manera similar a lo que ocurre en EHEC, en *C. rodentium* la expresión de EcpA se reprime en medio LB, mientras que en DMEM la condición que más favorece la expresión es a 26°C en condiciones estáticas.

#### 12.4 ROD\_29251 y FimK regulan de manera positiva la expresión de *ecp*

En *C. rodentium* el operón *ecp* está flanqueado por dos genes que codifican para las probables proteínas reguladoras, *fimK* y ROD\_29251 (Fig. 12). Ambas proteínas contienen un dominio EAL involucrado en el metabolismo del segundo mensajero GMP-dicíclico. Con el fin de determinar si los productos de estos genes están involucrados en la regulación del operón *ecp*, se generaron las cepas mutantes  $\Delta fimK$  y  $\Delta rod\_29251$ , como se describe en Materiales y Métodos. Estas cepas se transformaron con la fusión *ecpA*-582 y se analizó su actividad por ensayo de CAT. Como se puede observar en la Fig. 49A, en la cepa mutante en *fimK* la actividad de la fusión disminuye aproximadamente 53% con respecto a la cepa silvestre, mientras que en la mutante en ROD\_29251 la disminución de la expresión es del 100%. Este resultado sugiere que tanto FimK como ROD\_29251 regulan de manera positiva la expresión del operón *ecp*.



**Fig. 49.** FimK y ROD\_29251 regulan la expresión de *ecp*. **A)** Ensayo de actividad de CAT con las cepas DBS100 silvestre,  $\Delta fimK$ ,  $\Delta rod\_29251$  y  $\Delta ecpR$  transformadas con la fusión *ecpA*-582. La gráfica es el resultado de tres experimentos independientes con duplicado. **B)** "Western blot" con las cepas DBS100 EcpA-FLAG silvestre,  $\Delta fimK$ ,  $\Delta rod\_29251$  y  $\Delta ecpR$  crecidas en medio DME a 26°C en estático. DnaK fue detectado como control de carga.

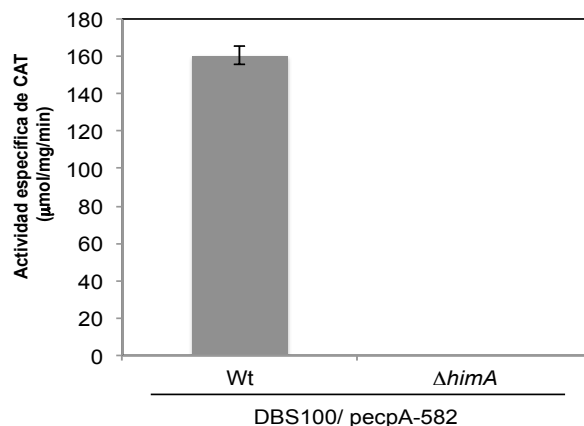
---

---

Este resultado se corroboró mediante “western blot” con las cepas DBS100 EcpA-FLAG silvestre,  $\Delta fimK$ ,  $\Delta rod\_29251$  y  $\Delta ecpR$  crecidas en medio DME a 26°C en estático. Como se puede observar en la Fig. 49B, se detecta a EcpA-FLAG en las cepas silvestre y mutante en *ecpR*, pero no en la mutante en *fimK* y ligeramente en la mutante en *rod\_29251*, confirmando el papel de ambos reguladores en la expresión de *ecp*.

### 12.5 IHF regula de manera positiva la expresión de *ecp*

Como se mencionó en el capítulo I, IHF regula de manera positiva la expresión de *ecp* en EPEC y EHEC. Con el fin de determinar si en *C. rodentium* IHF también interviene en la regulación, se construyó una cepa mutante en *himA* y se transformó con la fusión *ecpA*-582. La cepa resultante se incubó en medio DME a 26°C en estático y se analizó su actividad (Fig. 50). Como se observa en la gráfica, la actividad de la fusión disminuye 100% con respecto a la actividad en la cepa silvestre, indicando que IHF regula de manera positiva la expresión de *ecpA*.



**Fig. 50.** IHF es un regulador positivo de *ecp*. Ensayo de actividad de CAT con las cepas DBS100 silvestre y  $\Delta himA$  transformadas con la fusión *ecpA*-582 y crecidas en medio DME a 26°C en estático.

---

---

## 12.6 Discusión y Conclusiones

El operón *ecp* está conservado en varias cepas de *E. coli* tanto patógenas como no patógenas, así como en otras bacterias, incluyendo *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Shigella* y *Citrobacter*. En la mayoría de éstas, la organización de los genes involucrados en biogénesis se mantiene, mientras que la localización del gen que codifica para el regulador varía. En el caso de *C. rodentium*, el gen que codifica para el homólogo de *ecpR* se localiza corriente abajo del operón, inmediatamente después del gen ROD\_29251 y en orientación contraria. Por otro lado, la proteína codificada por este gen es la que posee la identidad más baja con su homóloga en EPEC y EHEC (Tabla 3). De acuerdo con este dato, está el hecho de que al parecer en *C. rodentium* *ecpR* no se expresa, al menos en las condiciones probadas en este estudio, y por lo tanto, la mutación de *ecpR* no tiene un efecto en la expresión de EcpA. El ligero incremento que se observa en la expresión de la fusión *ecpA*-582 en la cepa mutante con respecto a la cepa silvestre, puede ser probablemente un artificio, ya que este efecto no se observa por “western blot”.

Otra diferencia en la regulación con respecto a EPEC y EHEC es que en este caso, la expresión de *ecp* parece estar regulada por proteínas que contienen un dominio EAL. Algunas proteínas con este dominio están involucradas en la regulación de fimbrias, como es el caso de FimK, que regula negativamente la expresión de las fimbrias tipo I (Rosen et al, 2008) y MrkJ, que regula negativamente la expresión de las fimbrias tipo 3 (Johnson & Clegg, 2010), ambas en *Klebsiella pneumoniae*. El mecanismo de acción de estas proteínas no es mediante unión directa a DNA, sino a través del segundo mensajero GMP-di-cíclico, por lo que estarían arriba en una cascada de regulación que incluiría a un regulador todavía no identificado, el cual actuaría uniéndose sobre la región reguladora de *ecp*. A la fecha se desconoce si FimK regula la expresión de las fimbrias tipo I en *C. rodentium*, por lo que sería interesante analizar su papel en la regulación de estas fimbrias y determinar si existe regulación cruzada entre ambos operones. Por otro lado, vimos el regulador global IHF regula de manera positiva la expresión de *ecp*, de manera similar a lo que ocurre en EPEC y EHEC.

También al igual que para EPEC y EHEC, en *C. rodentium* la expresión de *ecp* se da cuando se cultiva a las bacterias en medio DME a 37°C ó 26°C. Ésta última temperatura

---

---

es la más favorable, lo que sugiere que, probablemente, las fimbrias ECP sean importantes para eventos fuera del hospedero, como la colonización y/o la transmisión.

Estos resultados son los antecedentes de la tesis del Biól. Andrés Escalera Maurer, la cual dirigí durante el último año del doctorado (Anexo II). En esta tesis se identificó el sitio de inicio de la transcripción de *ecpA*, el cual se encuentra a 88 pb corriente arriba del codón de inicio y contiene la secuencia consenso para promotores dependientes de sigma 70. Mediante un análisis de eliminación de la región reguladora se determinó que la región reguladora mínima comprende hasta la posición -407, con respecto al sitio de inicio de la transcripción, y que la región localizada entre las posiciones -407 y -332, con respecto al sitio de inicio de la transcripción, es importante para la expresión de *ecpA*, ya que una fusión que no contiene esta región es inactiva y la expresión no se recupera al hacer más recortes de la región reguladora. En este trabajo se observó también que aunque la mutación en *ecpR* no tiene un efecto en la expresión de *ecpA*, al sobre expresar a EcpR sí se detectó una disminución en la producción de EcpA por “western blot”, lo que sugiere que la proteína es funcional y que probablemente se expresa en condiciones distintas a las probadas en este estudio.



---

---

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham JM, Freitag CS, Clements JR, Eisenstein BI (1985) An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 5724-5727
- Adams LM, Simmons CP, Rezman L, Strugnell RA, Robins-Browne RM (1997) Identification and characterization of a K88- and CS31A-like operon of a rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* strain which encodes fimbriae involved in the colonization of rabbit intestine. *Infect Immun* **65**: 5222-5230
- Aldridge P, Paul R, Goymer P, Rainey P, Jenal U (2003) Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **47**: 1695-1708
- An H, Fairbrother JM, Desautels C, Mabrouk T, Dugourd D, Dezfoulian H, Harel J (2000) Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of *eae*, *espA*, *espB* and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. *Microb Pathog* **28**: 291-300
- Avelino F, Saldana Z, Islam S, Monteiro-Neto V, Dall'Agnol M, Eslava CA, Giron JA (2010) The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the *E. coli* common pilus when adhering to cultured epithelial cells. *Int J Med Microbiol* **300**: 440-448
- Baga M, Goransson M, Normark S, Uhlin BE (1988) Processed mRNA with differential stability in the regulation of *E. coli* pilin gene expression. *Cell* **52**: 197-206
- Bann JG, Frieden C (2004) Folding and domain-domain interactions of the chaperone PapD measured by 19F NMR. *Biochemistry* **43**: 13775-13786
- Baorto DM, Gao Z, Malaviya R, Dustin ML, van der Merwe A, Lublin DM, Abraham SN (1997) Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature* **389**: 636-639
- Barba J, Bustamante VH, Flores-Valdez MA, Deng W, Finlay BB, Puente JL (2005) A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrIA. *J Bacteriol* **187**: 7918-7930
- Barends TR, Hartmann E, Griese JJ, Beitlich T, Kirienko NV, Ryjenkov DA, Reinstein J, Shoeman RL, Gomelsky M, Schlichting I (2009) Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature* **459**: 1015-1018
- Barthold SW, Coleman GL, Bhatt PN, Osbaldiston GW, Jonas AM (1976) The etiology of transmissible murine colonic hyperplasia. *Lab Anim Sci* **26**: 889-894
- Barthold SW, Coleman GL, Jacoby RO, Livestone EM, Jonas AM (1978) Transmissible murine colonic hyperplasia. *Vet Pathol* **15**: 223-236
- Beeckman DS, Vanrompay DC (2010) Bacterial secretion systems with an emphasis on the chlamydial Type III secretion system. *Curr Issues Mol Biol* **12**: 17-41
- Bilge SS, Apostol JM, Jr., Aldape MA, Moseley SL (1993) mRNA processing independent of RNase III and RNase E in the expression of the F1845 fimbrial adhesin of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1455-1459
- Blackburn D, Husband A, Saldana Z, Nada RA, Klena J, Qadri F, Giron JA (2009) Distribution of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic *E. coli*. *J Clin Microbiol* **47**: 1781-1784

- 
- 
- Bloch CA, Stocker BA, Orndorff PE (1992) A key role for type 1 pili in enterobacterial communicability. *Mol Microbiol* **6**: 697-701
- Blomfield IC (2001) The regulation of pap and type 1 fimbriation in *Escherichia coli*. *Adv Microb Physiol* **45**: 1-49
- Blomfield IC, Calie PJ, Eberhardt KJ, McClain MS, Eisenstein BI (1993) Lrp stimulates phase variation of type 1 fimbriation in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **175**: 27-36
- Boles BR, McCarter LL (2002) *Vibrio parahaemolyticus* scrABC, a novel operon affecting swarming and capsular polysaccharide regulation. *J Bacteriol* **184**: 5946-5954
- Bomchil N, Watnick P, Kolter R (2003) Identification and characterization of a *Vibrio cholerae* gene, mbaA, involved in maintenance of biofilm architecture. *J Bacteriol* **185**: 1384-1390
- Brennan PC, Fritz TE, Flynn RJ, Poole CM (1965) *Citrobacter Freundii* Associated with Diarrhea in a Laboratory Mice. *Lab Anim Care* **15**: 266-275
- Brinton CC, Jr. (1959) Non-flagellar appendages of bacteria. *Nature* **183**: 782-786
- Bullitt E, Makowski L (1995) Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. *Nature* **373**: 164-167
- Bustamante VH, Villalba MI, Garcia-Angulo VA, Vazquez A, Martinez LC, Jimenez R, Puente JL (2011) PerC and GrIA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **82**: 398-415
- Capitani G, Eidam O, Grutter MG (2006) Evidence for a novel domain of bacterial outer membrane ushers. *Proteins* **65**: 816-823
- Casadaban MJ (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
- Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, Normark S, Hultgren SJ (2002) Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **295**: 851-855
- Choi SH, Greenberg EP (1991) The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 11115-11119
- Choudhury D, Thompson A, Stojanoff V, Langermann S, Pinkner J, Hultgren SJ, Knight SD (1999) X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **285**: 1061-1066
- Ciria R, Abreu-Goodger C, Morett E, Merino E (2004) GeConT: gene context analysis. *Bioinformatics* **20**: 2307-2308
- Clegg S, Wilson J, Johnson J (2011) More than one way to control hair growth: regulatory mechanisms in enterobacteria that affect fimbriae assembled by the chaperone/usher pathway. *J Bacteriol* **193**: 2081-2088
- Collinson SK, Emody L, Muller KH, Trust TJ, Kay WW (1991) Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. *J Bacteriol* **173**: 4773-4781
- Collinson SK, Emody L, Trust TJ, Kay WW (1992) Thin aggregative fimbriae from diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 4490-4495

---

---

Connell I, Agace W, Klemm P, Schembri M, Marild S, Svanborg C (1996) Type 1 fimbrial expression enhances Escherichia coli virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9827-9832

Craig L, Li J (2008) Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr Opin Struct Biol* **18**: 267-277

Craig L, Taylor RK, Pique ME, Adair BD, Arvai AS, Singh M, Lloyd SJ, Shin DS, Getzoff ED, Yeager M, Forest KT, Tainer JA (2003) Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of Vibrio cholerae toxin-coregulated pilus and Pseudomonas aeruginosa PAK pilin. *Mol Cell* **11**: 1139-1150

D'Argenio DA, Miller SI (2004) Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology* **150**: 2497-2502

Darwin AJ, Tyson KL, Busby SJ, Stewart V (1997) Differential regulation by the homologous response regulators NarL and NarP of Escherichia coli K-12 depends on DNA binding site arrangement. *Mol Microbiol* **25**: 583-595

Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6640-6645

Davis BD, Warren L, Physiologists SoG, Laboratory MB (1967) *The specificity of cell surfaces*: Prentice-Hall.

De la Cruz MA, Fernandez-Mora M, Guadarrama C, Flores-Valdez MA, Bustamante VH, Vazquez A, Calva E (2007) LeuO antagonizes H-NS and StpA-dependent repression in Salmonella enterica ompS1. *Mol Microbiol* **66**: 727-743

Donnenberg MS, Tzipori S, McKee ML, O'Brien AD, Alroy J, Kaper JB (1993) The role of the eae gene of enterohemorrhagic Escherichia coli in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest* **92**: 1418-1424

Dueholm MS, Nielsen SB, Hein KL, Nissen P, Chapman M, Christiansen G, Nielsen PH, Otzen DE (2011) Fibrillation of the major curli subunit CsgA under a wide range of conditions implies a robust design of aggregation. *Biochemistry* **50**: 8281-8290

Duguid JP, Smith IW, Dempster G, Edmunds PN (1955) Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in Bacterium coli. *J Pathol Bacteriol* **70**: 335-348

Eckmann L (2006) Animal models of inflammatory bowel disease: lessons from enteric infections. *Ann N Y Acad Sci* **1072**: 28-38

Ediger RD, Kovatch RM, Rabstein MM (1974) Colitis in mice with a high incidence of rectal prolapse. *Lab Anim Sci* **24**: 488-494

Egan SM, Stewart V (1991) Mutational analysis of nitrate regulatory gene narL in Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* **173**: 4424-4432

Egland KA, Greenberg EP (1999) Quorum sensing in Vibrio fischeri: elements of the luxI promoter. *Mol Microbiol* **31**: 1197-1204

Eisenstein BI, Sweet DS, Vaughn V, Friedman DI (1987) Integration host factor is required for the DNA inversion that controls phase variation in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6506-6510

---

---

Farmer JJ, 3rd, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, Riddle C, Wathen-Grady HG, Elias C, Fanning GR, et al. (1985a) Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* **21**: 46-76

Farmer JJ, 3rd, Fanning GR, Davis BR, O'Hara CM, Riddle C, Hickman-Brenner FW, Asbury MA, Lowery VA, 3rd, Brenner DJ (1985b) *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* **21**: 77-81

Fuqua C, Winans SC (1996) Localization of OccR-activated and TraR-activated promoters that express two ABC-type permeases and the traR gene of Ti plasmid pTiR10. *Mol Microbiol* **20**: 1199-1210

Galinier A, Garnerone AM, Reytrat JM, Kahn D, Batut J, Boistard P (1994) Phosphorylation of the *Rhizobium meliloti* FixJ protein induces its binding to a compound regulatory region at the fixK promoter. *J Biol Chem* **269**: 23784-23789

Galperin MY (2004) Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol* **6**: 552-567

Galperin MY, Nikolskaya AN, Koonin EV (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* **203**: 11-21

Garcia B, Latasa C, Solano C, Garcia-del Portillo F, Gamazo C, Lasa I (2004) Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol Microbiol* **54**: 264-277

Garcia-Angulo VA, Martinez-Santos VI, Villasenor T, Santana FJ, Huerta-Saquero A, Martinez LC, Jimenez R, Lara-Ochoa C, Tellez-Sosa J, Bustamante VH, Puente JL (2012) Transcriptional regulation of nle genes in attaching and effacing *Escherichia coli*: nleA versus nleH1 and nleB2, two distinct modes of regulation. *J Bacteriol*

Garmendia J, Frankel G, Crepin VF (2005) Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* **73**: 2573-2585

Garnett JA, Martinez-Santos VI, Saldana Z, Pape T, Hawthorne W, Chan J, Simpson PJ, Cota E, Puente JL, Giron JA, Matthews S (2012) Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 3950-3955

Giron JA, Ho AS, Schoolnik GK (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**: 710-713

Groisman EA (2001) *Principles of Bacterial Pathogenesis*: Elsevier Science.

Hahn E, Wild P, Hermanns U, Sebbel P, Glockshuber R, Haner M, Taschner N, Burkhard P, Aebi U, Muller SA (2002) Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili. *J Mol Biol* **323**: 845-857

Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, Olsen A, Normark S (1995) Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **18**: 661-670

Hart E, Yang J, Tauschek M, Kelly M, Wakefield MJ, Frankel G, Hartland EL, Robins-Browne RM (2008) RegA, an AraC-like protein, is a global transcriptional regulator that controls virulence gene expression in *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* **76**: 5247-5256

---

---

Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, Tanaka M, Tobe T, Iida T, Takami H, Honda T, Sasakawa C, Ogasawara N, Yasunaga T, Kuhara S, Shiba T, Hattori M, Shinagawa H (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* **8**: 11-22

Hernandes RT, Velsko I, Sampaio SC, Elias WP, Robins-Browne RM, Gomes TA, Giron JA (2011) Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol*

Holden NJ, Gally DL (2004) Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. *J Med Microbiol* **53**: 585-593

Holmgren A, Branden CI (1989) Crystal structure of chaperone protein PapD reveals an immunoglobulin fold. *Nature* **342**: 248-251

Huang Y, Smith BS, Chen LX, Baxter RH, Deisenhofer J (2009) Insights into pilus assembly and secretion from the structure and functional characterization of usher PapC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 7403-7407

Hultgren SJ, Lindberg F, Magnusson G, Kihlberg J, Tennent JM, Normark S (1989) The PapG adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* contains separate regions for receptor binding and for the incorporation into the pilus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 4357-4361

Hultgren SJ, Normark S, Abraham SN (1991) Chaperone-assisted assembly and molecular architecture of adhesive pili. *Annu Rev Microbiol* **45**: 383-415

Humphries AD, Raffatellu M, Winter S, Weening EH, Kingsley RA, Droleskey R, Zhang S, Figueiredo J, Khare S, Nunes J, Adams LG, Tsois RM, Baumler AJ (2003) The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial operons. *Mol Microbiol* **48**: 1357-1376

Hung DL, Pinkner JS, Knight SD, Hultgren SJ (1999) Structural basis of chaperone self-capping in P pilus biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8178-8183

Huys G, Cnockaert M, Janda JM, Swings J (2003) *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 807-810

Hwang I, Li PL, Zhang L, Piper KR, Cook DM, Tate ME, Farrand SK (1994) Tral, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 4639-4643

Ichikawa H, Halberg R, Kroos L (1999) Negative regulation by the *Bacillus subtilis* GerE protein. *J Biol Chem* **274**: 8322-8327

Jenal U (2004) Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Curr Opin Microbiol* **7**: 185-191

Johnson JG, Clegg S (2010) Role of MrkJ, a phosphodiesterase, in type 3 fimbrial expression and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **192**: 3944-3950

Jones CH, Danese PN, Pinkner JS, Silhavy TJ, Hultgren SJ (1997) The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *Embo J* **16**: 6394-6406

---

---

Jones CH, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Nicholes AV, Abraham SN, Hultgren SJ (1995) FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2081-2085

Jordi BJ, op den Camp IE, de Haan LA, van der Zeijst BA, Gaastra W (1993) Differential decay of RNA of the CFA/I fimbrial operon and control of relative gene expression. *J Bacteriol* **175**: 7976-7981

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic Escherichia coli. *Nat Rev Microbiol* **2**: 123-140

Kaplan HB, Greenberg EP (1987) Overproduction and purification of the luxR gene product: Transcriptional activator of the Vibrio fischeri luminescence system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6639-6643

Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C (1983) Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing Escherichia coli in stools. *Lancet* **1**: 619-620

Kawula TH, Orndorff PE (1991) Rapid site-specific DNA inversion in Escherichia coli mutants lacking the histonelike protein H-NS. *J Bacteriol* **173**: 4116-4123

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

Khursigara C, Abul-Milh M, Lau B, Giron JA, Lingwood CA, Barnett Foster DE (2001) Enteropathogenic Escherichia coli virulence factor bundle-forming pilus has a binding specificity for phosphatidylethanolamine. *Infect Immun* **69**: 6573-6579

Kim SH, Kim YH (2004) Escherichia coli O157:H7 adherence to HEp-2 cells is implicated with curli expression and outer membrane integrity. *J Vet Sci* **5**: 119-124

Klemm P (1986) Two regulatory fim genes, fimB and fimE, control the phase variation of type 1 fimbriae in Escherichia coli. *Embo J* **5**: 1389-1393

Kline KA, Dodson KW, Caparon MG, Hultgren SJ (2010) A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. *Trends Microbiol* **18**: 224-232

Kuehn MJ, Heuser J, Normark S, Hultgren SJ (1992) P pili in uropathogenic E. coli are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature* **356**: 252-255

Kuehn MJ, Ogg DJ, Kihlberg J, Slonim LN, Flemmer K, Bergfors T, Hultgren SJ (1993) Structural basis of pilus subunit recognition by the PapD chaperone. *Science* **262**: 1234-1241

Lasaro MA, Salinger N, Zhang J, Wang Y, Zhong Z, Goulian M, Zhu J (2009) F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the Escherichia coli commensal strain Nissle 1917. *Appl Environ Microbiol* **75**: 246-251

Lehti TA, Bauchart P, Dobrindt U, Korhonen TK, Westerlund-Wikstrom B (2012a) The fimbriae activator MatA switches off motility in Escherichia coli by repression of the flagellar master operon flhDC. *Microbiology* **158**: 1444-1455

Lehti TA, Bauchart P, Heikkinen J, Hacker J, Korhonen TK, Dobrindt U, Westerlund-Wikstrom B (2010) Mat fimbriae promote biofilm formation by meningitis-associated Escherichia coli. *Microbiology* **156**: 2408-2417

---

---

Lehti TA, Heikkinen J, Korhonen TK, Westerlund-Wikstrom B (2012b) The Response Regulator RcsB Activates Expression of Mat Fimbriae in Meningitic Escherichia coli. *J Bacteriol* **194**: 3475-3485

Levine MM, Bergquist EJ, Nalin DR, Waterman DH, Hornick RB, Young CR, 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

Li X, Mobley HLT (2001) Bacterial Pili and Fimbriae. In *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd

Low AS, Dziva F, Torres AG, Martinez JL, Rosser T, Naylor S, Spears K, Holden N, Mahajan A, Findlay J, Sales J, Smith DG, Low JC, Stevens MP, Gally DL (2006) Cloning, expression, and characterization of fimbrial operon F9 from enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Infect Immun* **74**: 2233-2244

Luperchio SA, Newman JV, Dangler CA, Schrenzel MD, Brenner DJ, Steigerwalt AG, Schauer DB (2000) Citrobacter rodentium, the causative agent of transmissible murine colonic hyperplasia, exhibits clonality: synonymy of C. rodentium and mouse-pathogenic Escherichia coli. *J Clin Microbiol* **38**: 4343-4350

Luperchio SA, Schauer DB (2001) Molecular pathogenesis of Citrobacter rodentium and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes Infect* **3**: 333-340

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

Mayer MP (1995) A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**: 41-46

Merkel TJ, Barros C, Stibitz S (1998) Characterization of the bvgR locus of Bordetella pertussis. *J Bacteriol* **180**: 1682-1690

Morett E, Fischer HM, Hennecke H (1991) Influence of oxygen on DNA binding, positive control, and stability of the Bradyrhizobium japonicum NifA regulatory protein. *J Bacteriol* **173**: 3478-3487

Mulvey MA (2002) Adhesion and entry of uropathogenic Escherichia coli. *Cell Microbiol* **4**: 257-271

Mulvey MA, Schilling JD, Martinez JJ, Hultgren SJ (2000) Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic Escherichia coli and innate host defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8829-8835

Mundy R, MacDonald TT, Dougan G, Frankel G, Wiles S (2005) Citrobacter rodentium of mice and man. *Cell Microbiol* **7**: 1697-1706

Nasser W, Reverchon S (2007) New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Anal Bioanal Chem* **387**: 381-390

Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic Escherichia coli. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201

Navarro-Garcia F, Elias WP (2011) Autotransporters and virulence of enteroaggregative E. coli. *Gut Microbes* **2**: 13-24

Neidhardt FC, Curtiss R (1996) *"Escherichia Coli" and "Salmonella": Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology.

---

---

Ng TW, Akman L, Osisami M, Thanassi DG (2004) The usher N terminus is the initial targeting site for chaperone-subunit complexes and participates in subsequent pilus biogenesis events. *J Bacteriol* **186**: 5321-5331

Nicholls L, Grant TH, Robins-Browne RM (2000) Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol* **35**: 275-288

Nilsson P, Naureckiene S, Uhlin BE (1996) Mutations affecting mRNA processing and fimbrial biogenesis in the *Escherichia coli* pap operon. *J Bacteriol* **178**: 683-690

Nilsson P, Uhlin BE (1991) Differential decay of a polycistronic *Escherichia coli* transcript is initiated by RNaseE-dependent endonucleolytic processing. *Mol Microbiol* **5**: 1791-1799

Nishiyama M, Horst R, Eidam O, Herrmann T, Ignatov O, Vetsch M, Bettendorff P, Jelesarov I, Grutter MG, Wuthrich K, Glockshuber R, Capitani G (2005) Structural basis of chaperone-subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD. *Embo J* **24**: 2075-2086

Nishiyama M, Vetsch M, Puorger C, Jelesarov I, Glockshuber R (2003) Identification and characterization of the chaperone-subunit complex-binding domain from the type 1 pilus assembly platform FimD. *J Mol Biol* **330**: 513-525

Nougayrède JP, Fernandes PJ, Donnenberg MS (2003) Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol* **5**: 359-372

Nuccio SP, Baumler AJ (2007) Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 551-575

O'Gara JP, Dorman CJ (2000) Effects of local transcription and H-NS on inversion of the fim switch of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **36**: 457-466

Ogierman MA, Zabihi S, Mourtziou L, Manning PA (1993) Genetic organization and sequence of the promoter-distal region of the tcp gene cluster of *Vibrio cholerae*. *Gene* **126**: 51-60

Olsen A, Jonsson A, Normark S (1989) Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* **338**: 652-655

Olsen PB, Klemm P (1994) Localization of promoters in the fim gene cluster and the effect of H-NS on the transcription of fimB and fimE. *FEMS Microbiol Lett* **116**: 95-100

Pallesen L, Madsen O, Klemm P (1989) Regulation of the phase switch controlling expression of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **3**: 925-931

Pawar DM, Rossman ML, Chen J (2005) Role of curli fimbriae in mediating the cells of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to attach to abiotic surfaces. *J Appl Microbiol* **99**: 418-425

Pellic V (2008) Type IV pili: e pluribus unum? *Mol Microbiol* **68**: 827-837

Perna NT, Plunkett G, 3rd, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Posfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A, Dimalanta ET, Potamousis KD, Apodaca J, Anantharaman TS, Lin J, Yen G, Schwartz DC, Welch RA, Blattner FR (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**: 529-533

Peterson SN, Reich NO (2006) GATC flanking sequences regulate Dam activity: evidence for how Dam specificity may influence pap expression. *J Mol Biol* **355**: 459-472



---

---

Peterson SN, Reich NO (2008) Competitive Lrp and Dam assembly at the pap regulatory region: implications for mechanisms of epigenetic regulation. *J Mol Biol* **383**: 92-105

Petty NK, Bulgin R, Crepin VF, Cerdano-Tarraga AM, Schroeder GN, Quail MA, Lennard N, Corton C, Barron A, Clark L, Toribio AL, Parkhill J, Dougan G, Frankel G, Thomson NR (2010) The *Citrobacter rodentium* genome sequence reveals convergent evolution with human pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **192**: 525-538

Pouttu R, Westerlund-Wikstrom B, Lang H, Alsti K, Virkola R, Saarela U, Siitonen A, Kalkkinen N, Korhonen TK (2001) matB, a common fimbriin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. *J Bacteriol* **183**: 4727-4736

Proft T, Baker EN (2009) Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci* **66**: 613-635

Puente JL, Bieber D, Ramer SW, Murray W, Schoolnik GK (1996) The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* **20**: 87-100

Remaut H, Rose RJ, Hannan TJ, Hultgren SJ, Radford SE, Ashcroft AE, Waksman G (2006) Donor-strand exchange in chaperone-assisted pilus assembly proceeds through a concerted beta strand displacement mechanism. *Mol Cell* **22**: 831-842

Remaut H, Tang C, Henderson NS, Pinkner JS, Wang T, Hultgren SJ, Thanassi DG, Waksman G, Li H (2008) Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway. *Cell* **133**: 640-652

Rendon MA, Saldana Z, Erdem AL, Monteiro-Neto V, Vazquez A, Kaper JB, Puente JL, Giron JA (2007) Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 10637-10642

Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**: 681-685

Romling U (2005) Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cell Mol Life Sci* **62**: 1234-1246

Rosen DA, Pinkner JS, Jones JM, Walker JN, Clegg S, Hultgren SJ (2008) Utilization of an intracellular bacterial community pathway in *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection and the effects of FimK on type 1 pilus expression. *Infect Immun* **76**: 3337-3345

Ryjenkov DA, Tarutina M, Moskvina OV, Gomelsky M (2005) Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J Bacteriol* **187**: 1792-1798

Saini S, Pearl JA, Rao CV (2009) Role of FimW, FimY, and FimZ in regulating the expression of type I fimbriae in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **191**: 3003-3010

Sakellaris H, Scott JR (1998) New tools in an old trade: CS1 pilus morphogenesis. *Mol Microbiol* **30**: 681-687

Saldana Z, Erdem AL, Schuller S, Okeke IN, Lucas M, Sivananthan A, Phillips AD, Kaper JB, Puente JL, Giron JA (2009) The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in

---

---

concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. *J Bacteriol* **191**: 3451-3461

Saldana Z, Sanchez E, Xicohtencatl-Cortes J, Puente JL, Giron JA (2011) Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by shiga-toxicogenic *Escherichia coli* O157:h7. *Front Microbiol* **2**: 119

Samadder P, Xicohtencatl-Cortes J, Saldana Z, Jordan D, Tarr PI, Kaper JB, Giron JA (2009) The *Escherichia coli* ycbQRST operon encodes fimbriae with laminin-binding and epithelial cell adherence properties in Shiga-toxicogenic *E. coli* O157:H7. *Environ Microbiol* **11**: 1815-1826

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467

Sauer FG, Futterer K, Pinkner JS, Dodson KW, Hultgren SJ, Waksman G (1999) Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. *Science* **285**: 1058-1061

Sauer FG, Pinkner JS, Waksman G, Hultgren SJ (2002) Chaperone priming of pilus subunits facilitates a topological transition that drives fiber formation. *Cell* **111**: 543-551

Saulino ET, Thanassi DG, Pinkner JS, Hultgren SJ (1998) Ramifications of kinetic partitioning on usher-mediated pilus biogenesis. *Embo J* **17**: 2177-2185

Scaletsky IC, Aranda KR, Souza TB, Silva NP (2010) Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells. *J Clin Microbiol* **48**: 302-306

Schaechter M (2009) *Desk Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier Science.

Schauer DB, Falkow S (1993) Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect Immun* **61**: 2486-2492

Schmidt AJ, Ryjenkov DA, Gomelsky M (2005) The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J Bacteriol* **187**: 4774-4781

Slonim LN, Pinkner JS, Branden CI, Hultgren SJ (1992) Interactive surface in the PapD chaperone cleft is conserved in pilus chaperone superfamily and essential in subunit recognition and assembly. *Embo J* **11**: 4747-4756

Smyth CJ, Marron MB, Twohig JM, Smith SG (1996) Fimbrial adhesins: similarities and variations in structure and biogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **16**: 127-139

So SS, Thanassi DG (2006) Analysis of the requirements for pilus biogenesis at the outer membrane usher and the function of the usher C-terminus. *Mol Microbiol* **60**: 364-375

Sohel I, Puente JL, Ramer SW, Bieber D, Wu CY, Schoolnik GK (1996) Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J Bacteriol* **178**: 2613-2628

Stevens AM, Dolan KM, Greenberg EP (1994) Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12619-12623

---

---

Stone KD, Zhang HZ, Carlson LK, Donnenberg MS (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

Struve C, Bojer M, Krogfelt KA (2008) Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect Immun* **76**: 4055-4065

Swenson DL, Kim KJ, Six EW, Clegg S (1994) The gene *fimU* affects expression of *Salmonella typhimurium* type 1 fimbriae and is related to the *Escherichia coli* tRNA gene *argU*. *Mol Gen Genet* **244**: 216-218

Tamayo R, Tischler AD, Camilli A (2005) The EAL domain protein *VieA* is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *J Biol Chem* **280**: 33324-33330

Tarr PI, Bilge SS, Vary JC, Jr., Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE (2000) *Iha*: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* **68**: 1400-1407

Thanassi DG, Saulino ET, Hultgren SJ (1998a) The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Curr Opin Microbiol* **1**: 223-231

Thanassi DG, Saulino ET, Lombardo MJ, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ (1998b) The *PapC* usher forms an oligomeric channel: implications for pilus biogenesis across the outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3146-3151

Thanassi DG, Stathopoulos C, Dodson K, Geiger D, Hultgren SJ (2002) Bacterial outer membrane ushers contain distinct targeting and assembly domains for pilus biogenesis. *J Bacteriol* **184**: 6260-6269

Thomas C, Andersson CR, Canales SR, Golden SS (2004) *PsfR*, a factor that stimulates *psbAI* expression in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Microbiology* **150**: 1031-1040

Torres AG, Giron JA, Perna NT, Burland V, Blattner FR, Avelino-Flores F, Kaper JB (2002) Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **70**: 5416-5427

Torres AG, Kanack KJ, Tutt CB, Popov V, Kaper JB (2004) Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains. *FEMS Microbiol Lett* **238**: 333-344

Torres AG, Li Y, Tutt CB, Xin L, Eaves-Pyles T, Soong L (2006) Outer membrane protein A of *Escherichia coli* O157:H7 stimulates dendritic cell activation. *Infect Immun* **74**: 2676-2685

Torres AG, Zhou X, Kaper JB (2005) Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun* **73**: 18-29

Turner SM, Scott-Tucker A, Cooper LM, Henderson IR (2006) Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **263**: 10-20

Uzzau S, Figueroa-Bossi N, Rubino S, Bossi L (2001) Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15264-15269

---

---

Vaisanen-Rhen V, Elo J, Vaisanen E, Siitonen A, Orskov I, Orskov F, Svenson SB, Makela PH, Korhonen TK (1984) P-fimbriated clones among uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* **43**: 149-155

Vallance BA, Finlay BB (2000) Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8799-8806

Waksman G, Hultgren SJ (2009) Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol* **7**: 765-774

Xicohtencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Ledesma MA, Jordan DM, Francetic O, Kaper JB, Puente JL, Giron JA (2007) Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Invest* **117**: 3519-3529

Zhou G, Mo WJ, Sebbel P, Min G, Neubert TA, Glockshuber R, Wu XR, Sun TT, Kong XP (2001) Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J Cell Sci* **114**: 4095-4103

Zhu J, Winans SC (2001) The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1507-1512

---

---

**14. Anexo I**

**Artículos Publicados y Tesis Dirigidas**

# Transcriptional Regulation of the *ecp* Operon by EcpR, IHF, and H-NS in Attaching and Effacing *Escherichia coli*

Verónica I. Martínez-Santos,<sup>a</sup> Abraham Medrano-López,<sup>a</sup> Zeus Saldaña,<sup>b</sup> Jorge A. Girón,<sup>b</sup> and José L. Puente<sup>a</sup>

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México,<sup>a</sup> and Department of Molecular Genetics and Microbiology, Emerging Pathogens Institute, University of Florida, Gainesville, Florida, USA<sup>b</sup>

**Enteropathogenic (EPEC) and enterohemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* are clinically important diarrheagenic pathogens that adhere to the intestinal epithelial surface. The *E. coli* common pili (ECP), or meningitis-associated and temperature-regulated (MAT) fimbriae, are ubiquitous among both commensal and pathogenic *E. coli* strains and play a role as colonization factors by promoting the interaction between bacteria and host epithelial cells and favoring interbacterial interactions in biofilm communities. The first gene of the *ecp* operon encodes EcpR (also known as MatA), a proposed regulatory protein containing a LuxR-like C-terminal helix-turn-helix (HTH) DNA-binding motif. In this work, we analyzed the transcriptional regulation of the *ecp* genes and the role of EcpR as a transcriptional regulator. EHEC and EPEC *ecpR* mutants produce less ECP, while plasmids expressing EcpR increase considerably the expression of EcpA and production of ECP. The *ecp* genes are transcribed as an operon from a promoter located 121 bp upstream of the start codon of *ecpR*. EcpR positively regulates this promoter by binding to two TTCCT boxes distantly located upstream of the *ecp* promoter, thus enhancing expression of downstream *ecp* genes, leading to ECP production. EcpR mutants in the putative HTH DNA-binding domain are no longer able to activate *ecp* expression or bind to the TTCCT boxes. EcpR-mediated activation is aided by integration host factor (IHF), which is essential for counteracting the repression exerted by histone-like nucleoid-structuring protein (H-NS) on the *ecp* promoter. This work demonstrates evidence about the interplay between a novel member of a diverse family of regulatory proteins and global regulators in the regulation of a fimbrial operon.**

Enteropathogenic (EPEC) and enterohemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* are intestinal pathogens that colonize the small gut and colon, respectively. EPEC is a major cause of infantile diarrhea, affecting principally children under 6 months of age in developing countries (51), while EHEC is a causative agent of hemorrhagic colitis (60) and the often-lethal hemolytic-uremic syndrome (HUS) (34). Both pathogens adhere to the host epithelial cells and inject effector proteins through a specialized secretion system called the type three secretion system (T3SS), leading to the formation of a distinctive histopathology known as the “attaching and effacing” (A/E) lesion. A/E lesion formation is characterized by the intimate adherence of the bacteria to the intestinal epithelium, which is mediated by the interaction between Tir and intimin; the effacement of the enterocyte microvilli; and the formation of a typical pedestal-like structure composed mainly of polymerized actin (11). Prior to these events, EPEC uses a type IV pilus, called a bundle-forming pilus (BFP) (27), to adhere to epithelial cells in a pattern known as localized adherence (LA) (32). In the case of EHEC, several fimbrial and nonfimbrial adhesins that contribute to adherence have been described, among which are the *E. coli* common pilus (ECP) (57), also called meningitis-associated and temperature-regulated (Mat) fimbriae in newborn meningitis-associated *E. coli* (NMEC) (53); the *E. coli* YcbQ laminin-binding fimbriae (ELF) (64); two long polar fimbriae (LPF) (19, 70); the F9 fimbriae (43); a type 4 pilus called “hemorrhagic coli pilus” (HCP) (77); curli (35, 62); the outer membrane proteins intimin (18) and OmpA (71); the EHEC factor for adherence (Efa1) (52); and the IgrA homologue adhesin (Iha) (69).

Fimbriae facilitate bacterial attachment to host tissues (23), which is one of the initial steps in colonization (54, 66). These structures are involved in bacterial aggregation (54) and biofilm formation (reviewed in reference 74) and contribute to bacterial

virulence (54). We have recently shown that the ECP is conserved in, and expressed by, the majority of pathogenic and nonpathogenic *E. coli* strains when cultured in tissue culture medium [e.g., Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM)] either at 26°C or 37°C and contributes to EHEC adherence to host epithelial cells (57) and to colonization of baby spinach leaves (63). In EPEC, along with BFP and other adhesins, ECP is involved in the interaction of the bacteria with host epithelial cells (61). ECP has also been shown to play a critical role in biofilm formation by NMEC isolate IHE 3034 (38) and in colonization of the infant mouse intestine by the *E. coli* commensal strain Nissle 1917 (37). The optimal environmental and nutritional conditions for ECP production may vary among the different pathogroups. For example, NMEC produces ECP when grown at 20°C in Luria-Bertani (LB) broth (53), whereas in enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) the pili are better produced after growth in pleuropneumonia-like organism (PPLO) broth at 37°C (6).

ECP (Mat) assembly into filamentous structures requires the function of all 6 genes composing the *ecp* operon (26, 38), which share the standard organization of fimbrial operons of the chaperone/usher pathway (30). The pili are built of a major structural subunit called EcpA (MatB), which is encoded by the second gene of the *ecp* (*mat*) operon, *ecpA* (*matB*) (26). The first gene, *ecpR*

Received 25 May 2012 Accepted 9 July 2012

Published ahead of print 13 July 2012

Address correspondence to José L. Puente, puente@ibt.unam.mx.

Supplemental material for this article may be found at <http://j.b.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.00915-12

(*matA*), codes for the EcpR (MatA) protein, which is proposed to be a regulatory protein since it contains a putative LuxR-like C-terminal helix-turn-helix (HTH) DNA-binding motif (53, 57). Proteins of this family are composed of two functional domains (50) and bind to DNA in a dimeric state, and some act as either classical transcriptional activators or transcriptional repressors in the presence or absence, respectively, of their cognate signal (50).

Proteins from this family are not commonly involved in transcriptional regulation of fimbrial operons or virulence genes in *E. coli*. However, in addition to specific regulators often encoded within each operon (4, 36), the expression of fimbrial operons is also affected by global regulators, such as the integration host factor (IHF) (22), the histone-like nucleoid-structuring protein (H-NS) (76) and the leucine-response regulatory protein (Lrp) (7, 24, 73).

In this study, we determined the function of EcpR as a positive regulator of its own expression and thus of the entire *ecp* operon in attaching and effacing *E. coli*. Deletion and site-directed mutational analysis, as well as *in vivo* footprinting, of the *ecp* regulatory region allowed the identification of regions involved in positive and negative regulation, as well as a sequence element consisting of two 5-bp direct repeats (TTCCT) distantly located at positions -189 to -185 and -211 to -207, with respect to the transcriptional start site, which are individually essential for EcpR-mediated activation. We also showed that IHF is essential for *ecp* expression and for counteracting the repression exerted by H-NS.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids and growth conditions.** The bacterial strains and plasmids used in this work are described in Table 1. Overnight cultures were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) broth with shaking. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 0.45% (wt/vol) glucose and L-glutamine (584 mg/liter), but without sodium pyruvate (Gibco BRL Life Technologies) and supplemented with pyridoxal (4 mg/ml), was used for growth at 37°C with shaking or 30°C in static conditions. When necessary, antibiotics were added at the following concentrations: ampicillin (Amp), 100 mg/ml; kanamycin (Km), 30 mg/ml; tetracycline (Tc), 15 mg/ml; chloramphenicol (Cm), 30 mg/ml; and streptomycin (Stp), 100 mg/ml.

**Molecular biology techniques.** DNA manipulations were performed according to standard protocols. Restriction and DNA-modifying enzymes were obtained from Invitrogen and used according to the manufacturers' instructions. Radiolabeled nucleotides ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  at 3,000 Ci mmol<sup>-1</sup>) were purchased from Amersham Corp. The oligonucleotides used for amplification by the PCR and for primer extension were synthesized by the Oligonucleotide Synthesis Facility at Instituto de Biología (UNAM, Cuernavaca, Mexico). PCRs were performed in volumes of 100 or 50  $\mu\text{l}$  with *Taq* polymerase (Perkin-Elmer) according to the manufacturers' instructions. Sequencing reactions of the plasmids generated in this work were carried out by the dideoxy chain termination procedure (65) using a Thermo Sequenase cycle sequencing kit according to the manufacturers' instructions (Amersham, Inc.) or performed at the Core Sequencing Facility at Instituto de Biología (UNAM, Cuernavaca, Mexico).

**RNA isolation and primer extension analysis.** Total RNA was isolated from samples of cultures of EPEC E2348/69 and EHEC EDL933 containing fusions *ecpRA*-P and *ecpRA*-H, respectively, grown up to an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 1.0 using an RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturers' instructions. The RNA concentration and quality were determined by measuring the A<sub>260</sub> and A<sub>280</sub>. Primer extension reactions were performed as described previously (44), with some modifications. Briefly, synthetic primer *ecpR*-Rev, complementary to the 5' *ecpR* coding region, was end labeled using T4 DNA kinase (In-

vitrogen) and  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . Labeled primer was hybridized with 10  $\mu\text{g}$  of total bacterial RNA and reverse transcribed for 90 min at 37°C using MLV reverse transcriptase (Invitrogen). The resulting cDNA was resolved through a sequencing gel and bands were visualized on Kodak X-Omat film.

**Reverse transcription-PCR.** Transcription of *ecpA* was assessed by reverse transcription-PCR (RT-PCR) using total RNA obtained from bacteria growing in DMEM for 6 h and the oligonucleotides listed in Table S1 in the supplemental material. Bacterial RNA was extracted as recommended by the manufacturer (Macherey-Nagel). First-strand cDNA synthesis was accomplished using One Step enzyme mix containing reverse transcriptase by following the manufacturer's protocol (Qiagen). Fifty nanograms of total RNA was used for each RT-PCR. Reverse transcription was carried out at 50°C for 30 min. Reaction mixtures containing no reverse transcriptase were used as negative controls.

**Construction of mutant strains.** Construction of mutant strains of EPEC E2348/69 and EHEC EDL933 was performed using the one-step gene inactivation method (17) using primers listed in Table S1 in the supplemental material. Strains containing plasmid pKD46 were electroporated with the PCR products, and the mutants were selected in LB plates containing Km. Replacement of the *ecpR* gene by the Km resistance cassette was verified by PCR using adjacent primers (see Table S1 in the supplemental material). To generate strain EHEC EDL933  $\Delta\text{ecpR}$ , the Km cassette was removed from the EDL933  $\Delta\text{ecpR}::\text{Km}$  strain using plasmid pCP20 (17).

**Construction of *ecpR*-*cat* and *ecpA*-*cat* transcriptional fusions and plasmids expressing EcpR.** Different oligonucleotides complementary to the regulatory and coding regions of *ecpR* and *ecpA* were designed to amplify by PCR various fragments that span different portions of the regulatory region (see Table S1 in the supplemental material). PCRs were performed using chromosomal DNA from wild-type EPEC E2348/69 or EHEC EDL933 as the template. The PCR fragments were digested with BamHI and HindIII (Invitrogen) and ligated into plasmid pKK232-8, which contains a promoterless *cat* gene (Pharmacia LKB Biotechnology), digested with the same enzymes. The positions of the sequence encompassed by each fusion with respect to the transcriptional start site of the *ecp* operon are indicated in Table 1. Fusions *ecpR*-4m1, *ecpR*-4m3, *ecpR*-4m4, *ecpR*-4IRm1, and *ecpR*-4IRm2 were constructed by overlapped PCR using primers *upEBS*-F and *upEBS*-R, *EBS*-F and *EBS*-R, *ecpRm4*-F and *ecpRm4*-R, *IHFBS*-F and *IHFBS*-R, and *IHFm*-F and *IHFm*-R, respectively (Table S1), and plasmid *pecpR*-4 as the template. First, the individual products were amplified with pKK-8-BHI and the respective reverse primers and with the respective forward primers and pKK-8-H3R. The products were cleaned with DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research) according to the manufacturers' instructions. The cleaned products were used for the overlapped PCR with primers pKK-8-BHI and pKK-8-H3R. Fusion *ecpR*-4m2 was generated by overlapped PCR using primers *EBSm2*-R and pKKA59F (see Table S1 in the supplemental material) to generate the first fragment and primers *EBSm2*-F and pKK-8-H3R (Table S1) to amplify the second, using plasmid *pecpR*-4 as the template. Both fragments were used as the template for a second PCR with primers pKK-8-BHI-F and pKK-8-H3R. In all cases the resulting fragments were digested with enzymes BamHI and HindIII and cloned into plasmid pKK232-8 digested with the same enzymes. pKK232-8 was used as a negative control in all assays.

Plasmids pT3-EcpR-400 and pK3-EcpR-400 were constructed using primers *ecpR*-400F and Km-SstI-R (see Table S1 in the supplemental material) and DNA from EPEC *ecpR*::3 $\times$ FLAG as the template (Table 1). The PCR products were digested with enzymes BamHI and SstI and cloned into plasmids pMPM-T3 and pMPM-K3 (Table 1), respectively, digested with the same enzymes.

**Microplate CAT assays.** The chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assay and protein determinations to calculate specific activity were performed as described previously (44, 55). The strains used in this work to determine CAT activity of different *cat* transcriptional fusions did not

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	41
E2348/69 $\Delta$ <i>ecpR</i> ::Km	E2348/69 carrying an in-frame deletion of <i>ecpR</i>	This study
E2348/69 EcpR-3 $\times$ FLAG	E2348/69 <i>ecpR</i> ::3 $\times$ FLAG-Km	Martínez-Santos, unpublished
JPEP36	E2348/69 $\Delta$ <i>hms</i> ::Km	García-Angulo et al., submitted
JPEP45	E2348/69 $\Delta$ <i>himA</i> ::Km	García-Angulo et al., submitted
JPEP44	E2348/69 $\Delta$ <i>fts</i> ::Km	García-Angulo et al., submitted
JPEP47	E2348/69 $\Delta$ <i>hha</i> ::Km	García-Angulo et al., submitted
JPEP40	E2348/69 $\Delta$ <i>stpA</i> ::Km	García-Angulo et al., submitted
EDL933	Wild-type EHEC O157:H7	60
EDL933 $\Delta$ <i>ecpR</i>	EDL933 carrying an in-frame deletion of <i>ecpR</i>	This study
EDL933 $\Delta$ <i>ecpA</i> ::Km	EDL933 carrying an in-frame deletion of <i>ecpA</i>	57
EDL933 $\Delta$ <i>hms</i> ::Km	EDL933 carrying an in-frame deletion of <i>hms</i>	This study
EDL933 $\Delta$ <i>himA</i> ::Km	EDL933 carrying an in-frame deletion of <i>himA</i>	This study
MC4100	<i>F' araD139 <math>\Delta</math>(argF-lac)U169 rpsL150 relA1 flb5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	12
JPMC1	MC4100 derivative, $\Delta$ <i>hms</i> :: <i>kan</i>	5
JPMC2	MC4100 derivative, $\Delta$ <i>himA</i> :: <i>kan</i>	10
JPMC35	MC4100 derivative, $\Delta$ <i>hms</i> $\Delta$ <i>himA</i> :: <i>kan</i>	10
DH5a	<i>supE44 <math>\Delta</math>lacU169 F80 lacZ <math>\Delta</math>M15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen
<b>Plasmids</b>		
pKD46	$\lambda$ Red recombinase system plasmid	17
pKD4	Km cassette template plasmid	17
pCP20	FLP recombinase plasmid	17
pMPM-T3	Low-copy-number cloning vector; p15A derivative; Tc <sup>r</sup>	45
pT3-EcpR-400	pMPM-T3 derivative carrying <i>ecpR</i> ::3 $\times$ FLAG plus its regulatory region up to position -288 with respect to the TSS	This study
pT3-EcpR	pT3-EcpR-400 derivative carrying <i>ecpR</i> ::3 $\times$ FLAG plus its regulatory region up to position -59 with respect to the TSS	This study
pT3-EcpR-D60A	pT3-EcpR expressing EcpR D60A	This study
pT3-EcpR-G159A	pT3-EcpR expressing EcpR G159A	This study
pT3-EcpR-N170K-T175A	pT3-EcpR expressing EcpR T175A/N170K	This study
pT3-EcpR-T175A	pT3-EcpR expressing EcpR T175A	This study
pT3-EcpR-V176A	pT3-EcpR expressing EcpR V176A	This study
pT3-EcpR-V176A-Q196L	pT3-EcpR expressing EcpR V176A/Q196L	This study
pT3-EcpR-K186A	pT3-EcpR expressing EcpR K186A	This study
pMPM-K3	Low-copy-no. cloning vector; p15A derivative; Km <sup>r</sup>	45
pK3-EcpR-400	pMPM-K3 derivative carrying <i>ecpR</i> ::3 $\times$ FLAG up to position -288 with respect to the TSS	This study
pBAD/Myc-His A	pBR322 derived-expression vector containing a C-terminal <i>myc</i> epitope tag and polyhistidine region	Invitrogen
pGTG	pBAD/Myc-His derivative expressing EcpR-MycHis	Martínez-Santos, unpublished
pKK232-8	pBR322 derivative containing a promoterless chloramphenicol acetyltransferase <i>cat</i> reporter gene	Pharmacia Biotech
pecpR-1H	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position -591 to +198 from EHEC	This study <sup>a</sup>
pecpR-1P	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position -590 to +198 from EPEC	This study
pecpR-2	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position -480 to +198	This study
pecpR-3	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position -379 to +198	This study
pecpR-4	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position -288 to +198	This study
pecpR-4m1	pecpR-4 with bases -212 to -208 changed from ATTCC to CGGAA	This study
pecpR-4m2	pecpR-4 with bases -194 to -191 changed from CAAA to ACCC	This study
pecpR-4m3	pecpR-4 with bases -198 to -187 changed from AGGGCAAAGTTC to CTTTACCTGGA	This study
pecpR-4m4	pecpR-4 with bases -189 to -186 changed from TTCC to GGAA	This study
pecpR-4IRm1	pecpR-4 with bases -97, -96, -93, and -92 changed from CAAT to GGCC, respectively	This study
pecpR-4IRm2	pecpR-4 with bases -100 to -89 changed from AAGCAATATTTT to GGGGCGCACCGG	This study
pecpR-5	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position -236 to +198	This study
pecpR-5 m	pecpR-5 with bases -220 to -213 changed from TTAAGACT to GGCCTCAG	This study
pecpR-6	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position -211 to +198	This study
pecpR-7	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position -199 to +198	This study
pecpR-8	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position -188 to +198	This study
pecpR-9	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position -103 to +198	This study
pecpR-10	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position -66 to +198	This study
pecpR-11	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position -38 to +198	This study
pecpR-12	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position -6 to +198	This study
pecpR-13	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position +26 to +198	This study
pecpR-14	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position +75 to +198	This study
pecpA-270	<i>ecpA-cat</i> transcriptional fusion from position -270 to +22 with respect to the <i>ecpA</i> start codon.	This study
pecpA-180	<i>ecpA-cat</i> transcriptional fusion from position -180 to +22	This study
pecpA-80	<i>ecpA-cat</i> transcriptional fusion from position -80 to +22	This study
pecpRA-P	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position -288 with respect to the TSS of <i>ecp</i> , to +22 with respect to the start codon of <i>ecpA</i> from EPEC	This study
pecpRA-H	<i>ecpR-cat</i> transcriptional fusion from position -288 with respect to the TSS, to +22 with respect to the start codon of <i>ecpA</i> from EHEC	This study

<sup>a</sup> Positions spanning the fragments contained in the transcriptional fusions are with respect to the transcriptional start site (TSS).



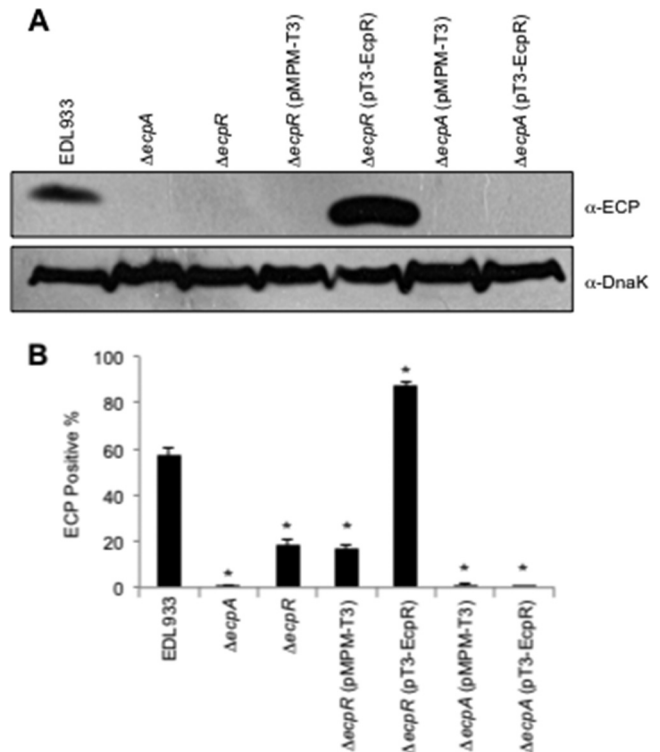
render measurable levels of CAT when carrying the empty vector pKK232-8 (data not shown).

**Flow cytometry.** Flow cytometry (FC) was used to detect the production of ECP and was performed as described previously (31). Briefly,  $10^6$  bacteria grown overnight in DMEM were incubated with 2% formalin for 10 min. Formalin was removed by centrifugation and repeated washes with PBS. Formalin-treated cells were incubated with anti-ECP antibodies overnight at 4°C. Bacterial cells were then washed and incubated with goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 conjugated for 1 h at 4°C. The Alexa Fluor fluorescence emission was collected through a 30-nm band pass filter centered at 530 nm in which 50,000 events were measured. Bacteria were labeled with propidium iodide and detected through a 42-nm band pass centered at 585 nm. The samples were analyzed in a Becton Dickinson FACScan.

**Western immunoblotting.** Overnight LB bacterial cultures of wild-type EHEC EDL933, or wild-type EPEC E2348/69 and their mutant derivatives in different regulatory genes, were subcultured into DMEM and incubated at room temperature under static growth conditions up to an  $OD_{600}$  of 1.0. Three milliliters of each bacterial suspension was pelleted and resuspended in 200  $\mu$ l  $1 \times$  PBS. Then samples were sonicated for 3 min, 60  $\mu$ l of Laemmli buffer was added, and the mixture was boiled for 5 min. The samples were then subjected to SDS-PAGE (12% polyacrylamide) and transferred to 0.22- $\mu$ m-pore-size nitrocellulose membranes (Amersham, United Kingdom). Membranes were blocked with 5% non-fat milk and incubated with antibodies against ECP (43), FLAG, Myc and DnaK (Invitrogen) (diluted 1:15,000, 1:5,000, 1:5,000 and 1:10,000, respectively). Membranes were washed with phosphate-buffered saline (PBS)–0.3% Tween 20, immunostained with a 1:10,000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Biomedica), and developed with Western Lightning Plus-ECL chemiluminescence reagents (Perkin Elmer) according to the manufacturer's instructions. Bands were detected with X-ray film.

**Site-directed PCR mutagenesis.** Oligonucleotide site-directed mutagenesis to replace selected *ecpR* codons for alanine codons was performed using the QuikChange kit (Stratagene). Reactions were performed using plasmid pT3-EcpR-400 as the template (Table 1). The secondary mutations N170K and Q196L in the two double mutants were randomly obtained while generating single mutants with residues T175 and V176, respectively. To prevent the autoregulatory effect of wild-type EcpR and functional EcpR mutants, the regulatory region containing the EcpR-binding sites from pT3-EcpR-400, and from the resulting plasmids carrying mutated *ecpR* genes, was removed by digesting their DNA with EcoRI and religation, generating the pT3-EcpR series (Table 1). All the constructs were verified by DNA sequencing.

**In vivo footprinting.** Footprinting of the *ecpR* regulatory region was performed *in vivo* using a system of two compatible plasmids as previously described (48), with slight modifications. EHEC EDL933  $\Delta$ *ecpR* carrying plasmid pEcpR-4 or pEcpR-4m2, plus either the empty vector pMPM-T3 or its derivative pT3-EcpR or pT3-EcpR-K186A (expressing wild-type EcpR or the EcpR K186A mutant, respectively), was grown in 5-ml shaken LB cultures at 37°C overnight. The strains were subcultured into 10 ml of DMEM and grown for 6 h at 37°C with shaking. Culture samples were collected, to which freshly prepared dimethyl sulfate (DMS) at a final concentration of 0.1% (vol/vol) was added for 1 min. Then the cultures were centrifuged at 12,000 rpm for 5 min at 4°C, and the pellet was washed twice with ice-cold saline phosphate solution (150 mM NaCl, 40 mM  $K_2HPO_4$ , 22 mM  $KH_2PO_4$  [pH 7.2]). Methylated plasmid DNA was isolated using a High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science), according to the manufacturer's instructions, and it was eluted in 50  $\mu$ l of water. Plasmid DNA was cleaved at the methylated positions by adding 5  $\mu$ l of 1 M piperidine and incubating it at 90°C for 30 min, and then the DNA was precipitated with butanol, washed extensively with 70% ethanol, and finally dissolved in 100  $\mu$ l of  $H_2O$ . Primer extension reactions were performed using [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]ATP 5'-labeled oligonucleotides pKK-8-BHI and *ecpR*-3R (see Table S1 in the supplemental material), comple-

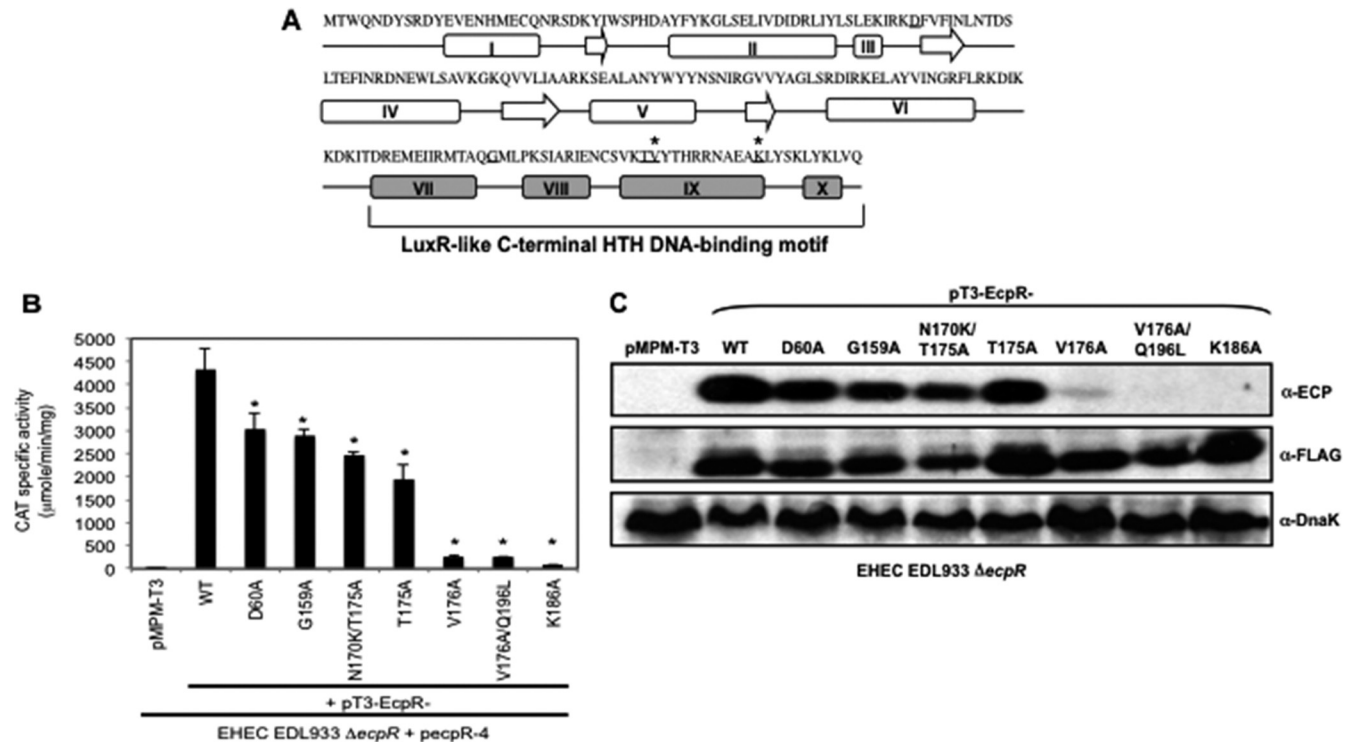


**FIG 1** EcpR is required for the synthesis of ECP. (A) Western blot analysis of whole-cell extracts of EHEC EDL933 wild type,  $\Delta$ *ecpA*,  $\Delta$ *ecpR*,  $\Delta$ *ecpR*/pMPM-T3,  $\Delta$ *ecpR*/pT3-EcpR,  $\Delta$ *ecpA*/pMPM-T3, and  $\Delta$ *ecpA*/pT3-EcpR (Table 1) grown in DMEM at 30°C in static cultures. DnaK was detected as a loading control. (B) Production of ECP by wild-type EHEC and its isogenic *ecpA* and *ecpR* mutants, analyzed by flow cytometry using anti-ECP antibodies and goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 conjugate; 10,000 events were measured. Bacteria were recovered from the supernatant of HeLa cells infected for 6 h at 37°C. Error bars represent the standard deviations of three independent assays done in duplicate. \*,  $P < 0.02$  between wild-type and mutant strains, calculated using the unpaired Student *t* test.

mentary to the pKK232-8 plasmid and the regulatory region of *ecp*, respectively, which were mixed with approximately 2  $\mu$ g of methylated DNA in a final volume of 30  $\mu$ l of TM buffer (10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM Tris-HCl [pH 8.0]). Annealing was carried out by boiling the above mixture for 3 min and then immediately placing it into ice. Primers were extended with 1 U of the Klenow fragment of DNA polymerase I (Roche Applied Science) plus 0.1 mM each deoxynucleotide triphosphate for 10 min at 50°C. The extension products were precipitated, dried, suspended in loading buffer, and separated by gel electrophoresis on 7% polyacrylamide gels containing 8 M urea together with a sequence ladder using the same primers. The gel was dried and exposed to Kodak X-Omat film for 1 to 3 days.

## RESULTS

**EcpR acts as a positive regulator.** The *ecp* or *mat* cluster comprises 6 genes named *ecpRABCDE* (also known as *matABCDEF*) (Fig. 3A). This operon was first described in NMEC as encoding meningitis-associated and temperature-regulated (Mat) fimbriae because it is mainly expressed at 20°C (38, 53). However, it was later shown to be conserved in, and expressed by, all *E. coli* pathotypes, not only NMEC, as well as by commensal *E. coli* strains, even at 37°C, and thus, the name *E. coli* common pilus (ECP) was proposed as an alternative to Mat to appropriately describe its ubiquitousness in *E. coli* (3, 6, 29, 57, 61, 63). This cluster seems to



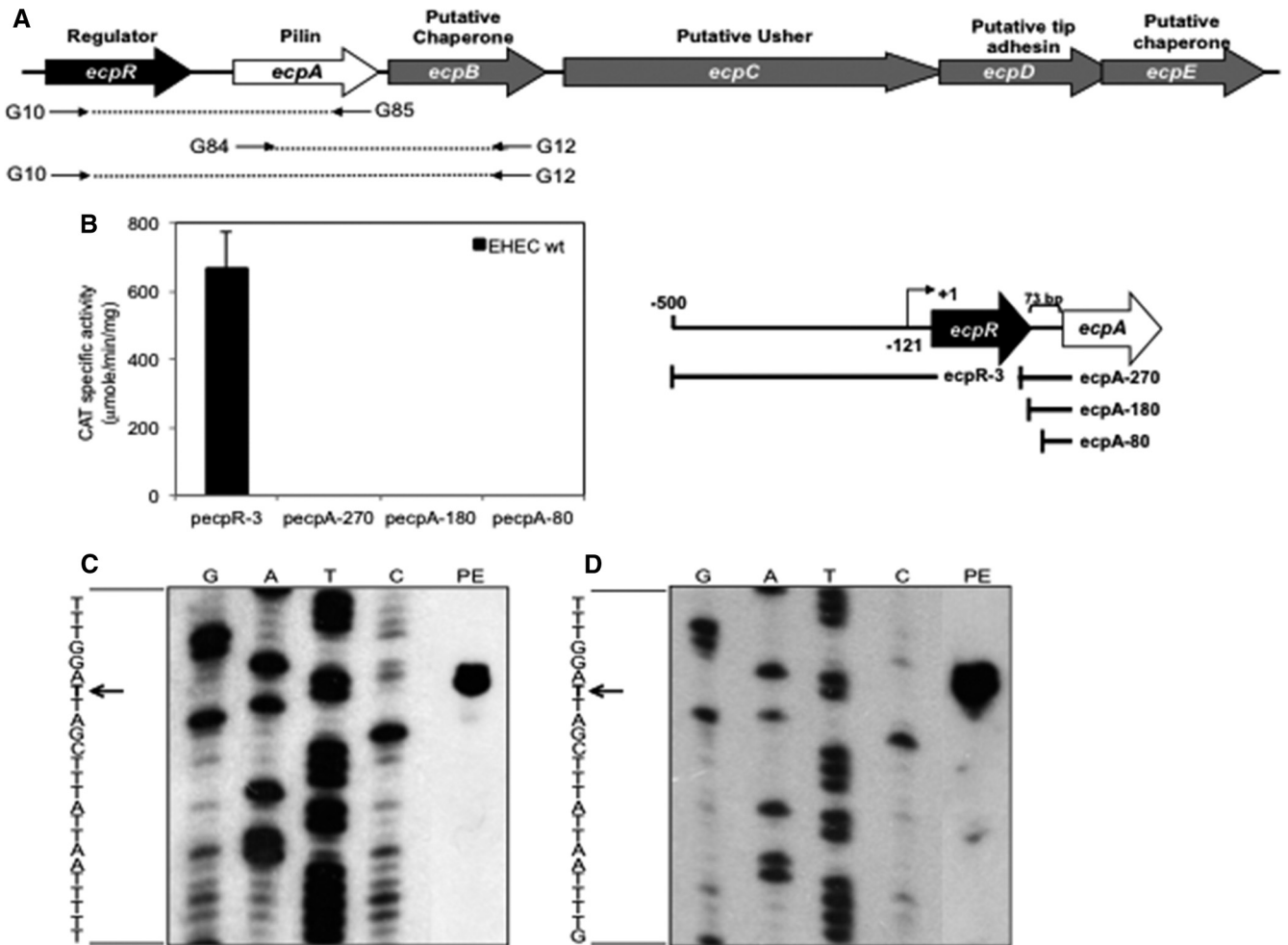
**FIG 2** Mutations in the predicted HTH DNA-binding domain of EcpR affect its function. (A) Schematic representation of the predicted secondary structure of EcpR using the PSIPRED server. The arrows indicate  $\beta$  strands, and the rectangles represent  $\alpha$  helices. Amino acids replaced by alanine are underlined. The asterisks indicate residues that affect EcpR activity when replaced by alanines. Helices VII, VIII, IX, and X corresponding to the putative EcpR HTH DNA-binding domain are shown in gray. (B) CAT activity assay with EDL933  $\Delta$ ecpR containing fusion ecpR-4 complemented with vector pMPM-T3 or plasmids encoding wild-type EcpR (pT3-EcpR) or the EcpR mutants (pT3-EcpR-D60A, pT3-EcpR-G159A, pT3-EcpR-N170KT175A, pT3-EcpR-T175A, pT3-EcpR-V176A, pT3-EcpR-V176AQ196L, and pT3-EcpR-K186A). The resulting strains were grown in DMEM at 37°C with shaking for 6 h. Error bars represent the standard deviations of the activity of three independent assays done in duplicate. \*,  $P < 0.0001$  between mutants and wild-type EcpR. (C) Western blot of whole-cell extracts of EHEC  $\Delta$ ecpR transformed with vector pMPM-T3 or with plasmids encoding wild-type EcpR or the mutants. EcpR was detected with  $\alpha$ -FLAG antibodies. DnaK was detected as a loading control.

share the standard genetic organization of the majority of the fimbrial gene clusters present in *E. coli* and *Salmonella* (30, 47). The second gene of the cluster codes for the 21-kDa main structural fimbrial subunit EcpA. Genes encoding a putative chaperone (ecpB) and usher (ecpC) make up the middle of the cluster. At the end are ecpD and ecpE, both of which share homology to genes encoding putative fimbrial proteins of *Proteus mirabilis* (data not shown). EcpD is a tip adhesin capable of assembling into thin filaments in the absence of EcpA (26) and EcpE is a potential chaperone.

The first gene of the cluster codes for EcpR, a 196-amino-acid (aa) protein predicted to possess an HTH DNA-binding motif (Fig. 2A) that has similarity to regulatory proteins from the LuxR/FixJ family (see Fig. S1 in the supplemental material). Proteins from this family have been shown to act as classic activators or repressors (reviewed in reference 50). To provide clues regarding the potential role of EcpR in ecp regulation, we analyzed by Western blotting the production of EcpA in bacterial cell extracts from wild-type EHEC strain EDL933 and its  $\Delta$ ecpR and  $\Delta$ ecpA mutant derivatives, or the mutants carrying the empty vector pMPM-T3 or a plasmid coding for EcpR (pT3-EcpR) (Fig. 1A and Table 1). There is no EcpA production in the ecpA mutant alone or carrying either plasmid. The production of EcpA was reduced in the ecpR mutant alone or carrying vector pMPM-T3, while it was enhanced above the production detected in the wild-type strain when the

mutant was complemented with pT3-EcpR. Similar observations were obtained by flow cytometry (Fig. 1B). In the ecpR mutant the production of ECP was reduced about 66%, and when complemented with plasmid pT3-EcpR, the production of ECP increased about 50% with respect to that of the wild-type strain. Together these results show that EcpR has a positive effect on the production of the ECP proteins.

**Point mutations in the C terminus of EcpR affect its function.** In order to further evaluate the transcriptional activator nature of EcpR and the role of its putative HTH DNA-binding domain, alanine substitutions of residues D60, G159, T175, V176 and K186 (Fig. 2A), which include some of the most conserved residues at the HTH domain of well-characterized proteins of the LuxR family, such as NarL, UhpA, FixJ, GerE, MalT and LuxR (see Fig. S1 in the supplemental material), were generated. The resulting plasmids, pT3-EcpR-D60A, -G159A, -T175A, -V176A, and -K186A, as well as the spontaneous double mutants pT3-EcpR-N170K-T175A and -V176A-Q196L (Table 1), were tested for their ability to activate the pcpR-4 fusion (Table 1) in the EHEC  $\Delta$ ecpR mutant (Fig. 2B). The EcpR D60A, G159A, and T175A mutants, as well as the N170K/T175A double mutant, showed only a modest reduction in their activation capacity compared to the wild-type protein. In contrast, the EcpR V176A, V176A/Q196L, and K186A mutants were unable to activate the pcpR-4 fusion. The phenotype of these mutants was further analyzed by testing their capac-

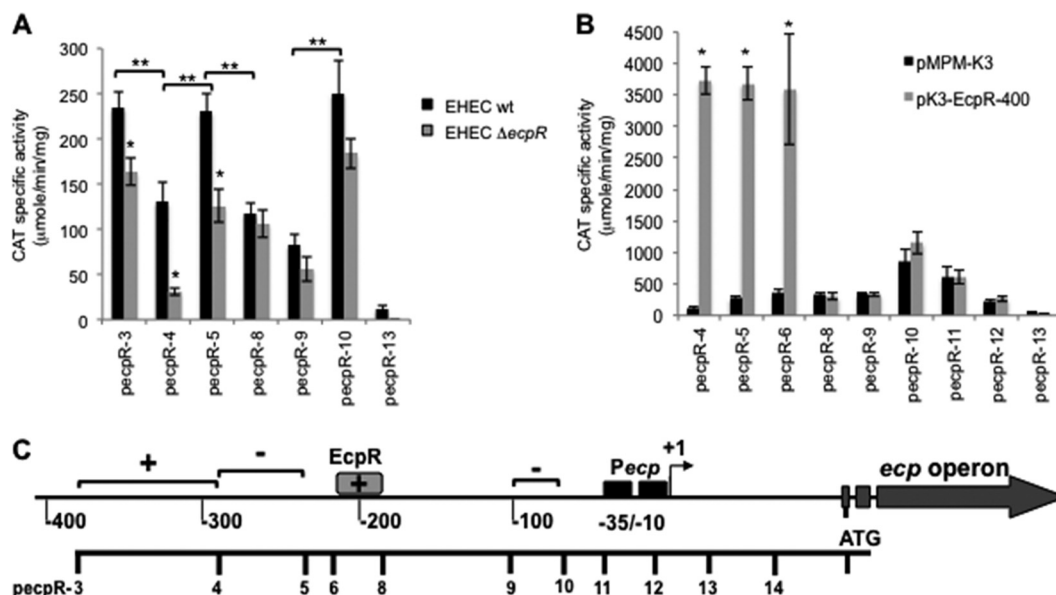


**FIG 3** The *ecpRABCDE* genes are transcribed as an operon. (A) Schematic representation of the *ecp* cluster formed by genes *ecpR* and *ecpA* to *ecpE*. The putative function of each gene is indicated above the big arrows. The arrows below the schematic represent the primers used for RT-PCR, and the dashed lines represent the products obtained with each pair of primers. (B) CAT activity produced by EHEC EDL933 transformed with fusions *ecpR-3*, *ecpA-270*, *ecpA-180*, and *ecpA-80* (left panel). Error bars indicate standard deviations of results from three independent experiments with duplicates. The right panel is the schematic representation of the *ecpR* and *ecpA-cat* transcriptional fusions used in the left panel. The broken arrow indicates the transcriptional start site. The *ecpA* gene is separated from *ecpR* by 73 bp. As a negative control, the strain transformed with vector pKK232-8 was used. (C and D) Identification of the transcriptional start site. Total RNA from the wild-type EHEC strain EDL933 (C) and EPEC E2348/69 (D) transformed with fusions *ecpRA-H* and *ecpRA-P*, respectively, was extracted from DMEM culture samples collected at an  $OD_{600}$  of 1.0. A primer specific for the 5' end of the coding region of *ecpR* (positions +136 to +156, with respect to the transcriptional start site) and 10 μg of total RNA were used for the primer extension reaction, as indicated in Materials and Methods. The arrows indicate the bases corresponding to the transcriptional start sites.

ity to activate the production of EcpA by Western blotting (Fig. 2C). The mutants that activated the expression of *pecpR-4* were also able to complement EcpA synthesis in EHEC  $\Delta$ *ecpR*, but not those mutants that showed a defect activating the fusion (Fig. 2B and C). These results indicated that the conserved residues V176 and K186 are essential for the activity of EcpR and suggested that the HTH domain is likely involved in protein-DNA interactions. The lack of function of the three inactive EcpR mutants was not due to the lack of expression, since the FLAG epitope was detected at similar levels in the wild-type and mutants, as seen by Western blotting using an anti-FLAG antibody (Fig. 2C).

**The *ecp* cluster is transcribed as an operon from a promoter located upstream of *ecpR*.** In order to determine whether *ecpR* is transcribed with the rest of the genes in the cluster, we performed RT-PCR experiments using primers derived from the beginning or the end of *ecpR*, *ecpA* and *ecpB* (Fig. 3A). We were able to detect

mRNA for *ecpR*, *ecpA*, and *ecpB* (data not shown), indicating that at least these three genes are transcribed as an operon and that transcription is initiated upstream of *ecpR*. Since *ecpA* codes for the structural subunit of ECP, we then explored the possibility that, in addition to being transcribed from the *ecpR* promoter, the *ecpA* gene could also be expressed from an internal promoter driving the expression of the genes involved in ECP biogenesis. With this purpose, we constructed three transcriptional fusions containing different portions of the *ecpR-ecpA* intergenic region and a fusion carrying the putative upstream regulatory region of *ecpR* to the promoterless chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) gene, as described in Materials and Methods. The resulting fusions, *ecpA-270*, *ecpA-180* and *ecpA-80* (Fig. 3B, right panel), were inactive when tested in EHEC EDL933 (Fig. 3B, left panel), while a fusion containing the *ecpR* upstream region (*ecpR-3*) was active. This result further supported the notion



**FIG 4** Identification of regulatory elements involved in *ecp* regulation. (A) Expression of *cat* transcriptional fusions contained in plasmids *ecpR*-3, *ecpR*-4, *ecpR*-5, *ecpR*-8, *ecpR*-9, *ecpR*-10, and *ecpR*-13 in wild-type EHEC EDL933 and its  $\Delta$ *ecpR* isogenic mutant. (B) Expression of *cat* transcriptional fusions contained in plasmids *ecpR*-4, *ecpR*-5, *ecpR*-6, *ecpR*-8, *ecpR*-9, *ecpR*-10, *ecpR*-11, *ecpR*-12, and *ecpR*-13 in EHEC  $\Delta$ *ecpR* also carrying vector pMPM-K3 or plasmid pK3-EcpR-400. CAT-specific activity was determined from samples obtained from static DMEM cultures grown at 30°C. Error bars represent the standard deviations of the activity of three independent assays done in duplicate. \*,  $P < 0.0001$  between gray and black bars in panels A and B. \*\*,  $P < 0.0001$  between black bars in panel A. (C) Schematic representation of the regulatory region of *ecp*. The broken arrow indicates the transcriptional start site, and the black boxes represent the  $-10$  and  $-35$  boxes. Brackets represent positive (+) and negative (-) regulatory elements. The gray box spans the proposed EcpR-binding site according to the deletion analysis. The scale below the schematic indicates the 5' end of each fusion.

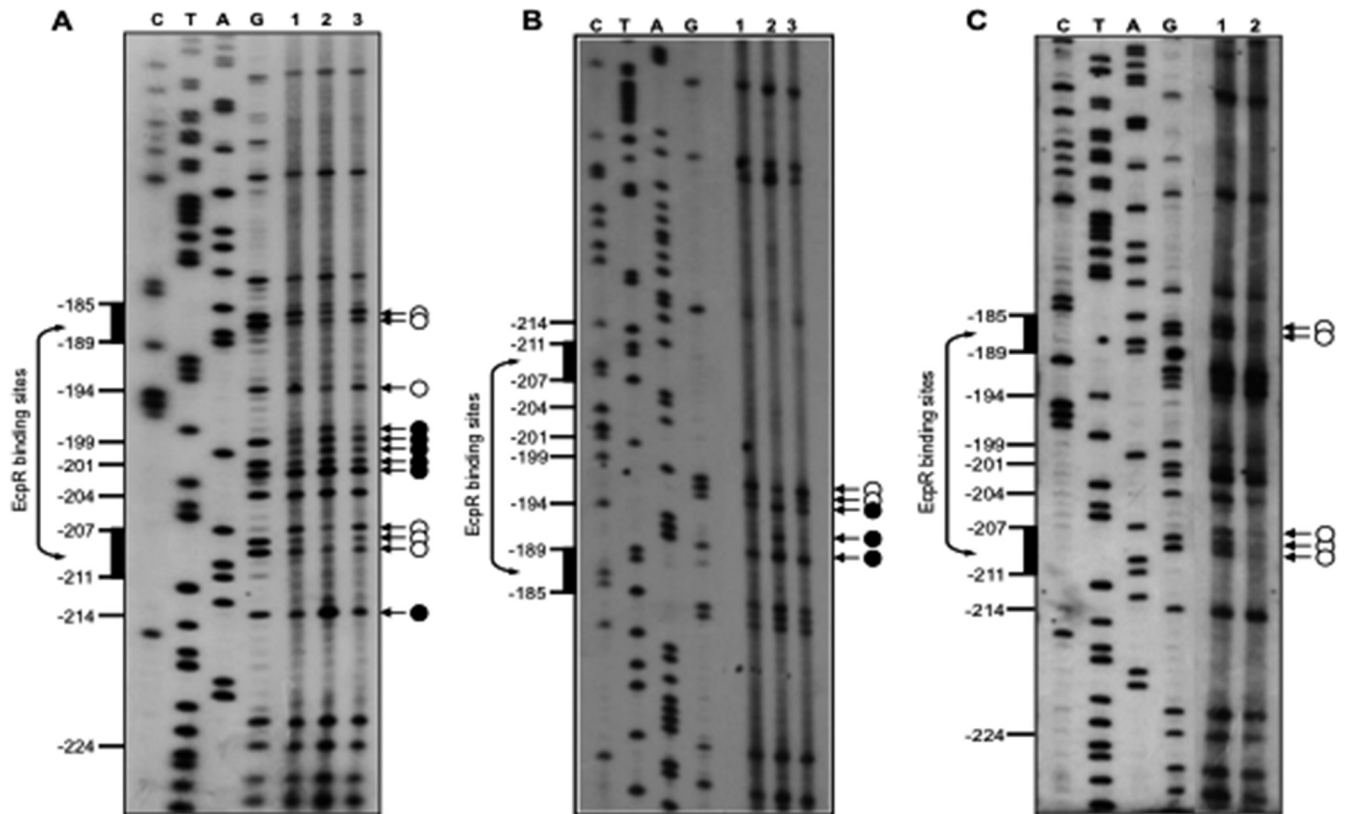
that the *ecp* cluster is transcribed from a promoter located upstream of *ecpR*.

In order to identify its promoter and to begin a detailed analysis of the regulatory region of the *ecp* operon, we performed primer extension experiments using RNA samples obtained from EHEC strain EDL933 and EPEC strain E2348/69 carrying plasmids *pecpRA*-H and *pecpRA*-P, respectively. The results of these experiments revealed that the *ecp* transcriptional start site corresponds to two A residues located 121 and 120 nucleotides upstream of the start codon of EHEC and EPEC *ecpR* (Fig. 3C and D), respectively. The putative  $-35$  (TTGACA) and  $-10$  (ATAAAT) boxes are separated by 17 nucleotides and contain six and three (underlined) out of six bases that are present in the consensus  $-35$  and  $-10$  sequences, respectively (Fig. 5A), of sigma 70-dependent promoters in *E. coli*.

**Identification of cis-acting regulatory elements.** The regulatory region of *ecp* is 99% identical between EPEC E2348/69 and EHEC EDL933, having just a few differences that may not affect expression. To evaluate this possibility, we compared the activities of both the EHEC (*ecpR*-1H) and EPEC (*ecpR*-1P) *ecpR*-*cat* fusions. The levels of activity of these fusions were similar when tested in both EPEC and EHEC (data not shown), indicating that the few changes between the *ecp* regulatory sequences of EPEC and EHEC do not modify their expression. Then, in order to identify regulatory elements involved in the transcriptional regulation of the *ecp* operon, we constructed several *cat* transcriptional fusions spanning different fragments of the regulatory region of *ecp* (Table 1; Fig. 4C). All fusions contained a common 3' end at position +198 with respect to the transcriptional start site and serial eliminations of DNA sequences of the regulatory region from the 5'

end. These fusions were introduced into EHEC EDL933, and CAT activity was determined under growth conditions that enhance ECP expression (DMEM cultures at 30°C) (Fig. 4A). Fusion *ecpR*-3 showed an activity similar to that seen for *ecpR*-1H and *ecpR*-2 in wild-type EHEC (data not shown), while the *ecpR*-4 fusion showed an activity approximately 44% lower, suggesting that there is a positive regulatory element between positions  $-379$  and  $-288$ . The *ecpR*-5 fusion showed an activity similar to that of fusion *ecpR*-3, suggesting that there is a negative regulatory region between positions  $-288$  and  $-236$ . Fusions *ecpR*-8 and *ecpR*-9 had an activity of 50 and 64%, respectively, lower than that of fusion *ecpR*-5, suggesting the presence of a positive regulatory element between positions  $-236$  and  $-188$ , while fusion *ecpR*-10 showed almost three times the activity of fusion *ecpR*-9, suggesting that a negative regulatory element exists between positions  $-103$  and  $-66$  (Fig. 4A and C). The *ecpR*-13 fusion showed background levels of activity that were consistent with the fact that it does not contain the putative promoter. These analyses allowed us to get insights into the distribution of regulatory elements at the upstream region of *ecpR* that are involved in both positive and negative regulation of *ecp*.

**EcpR acts at the transcriptional level.** As described above, EcpR has a positive influence on the expression of the *ecp* promoter. To further characterize the role of EcpR as a positive regulator of *ecp*, we tested the *ecpR*-*cat* transcriptional fusions in an EHEC  $\Delta$ *ecpR* strain (Fig. 4A, gray bars). The activity of the *ecpR*-3 fusion in the mutant strain was slightly reduced (approximately 30%) with respect to the activity seen in wild-type EHEC; however, the activity of fusions *ecpR*-4 and *ecpR*-5 was reduced (~76% and 45%, respectively) in the absence of EcpR compared



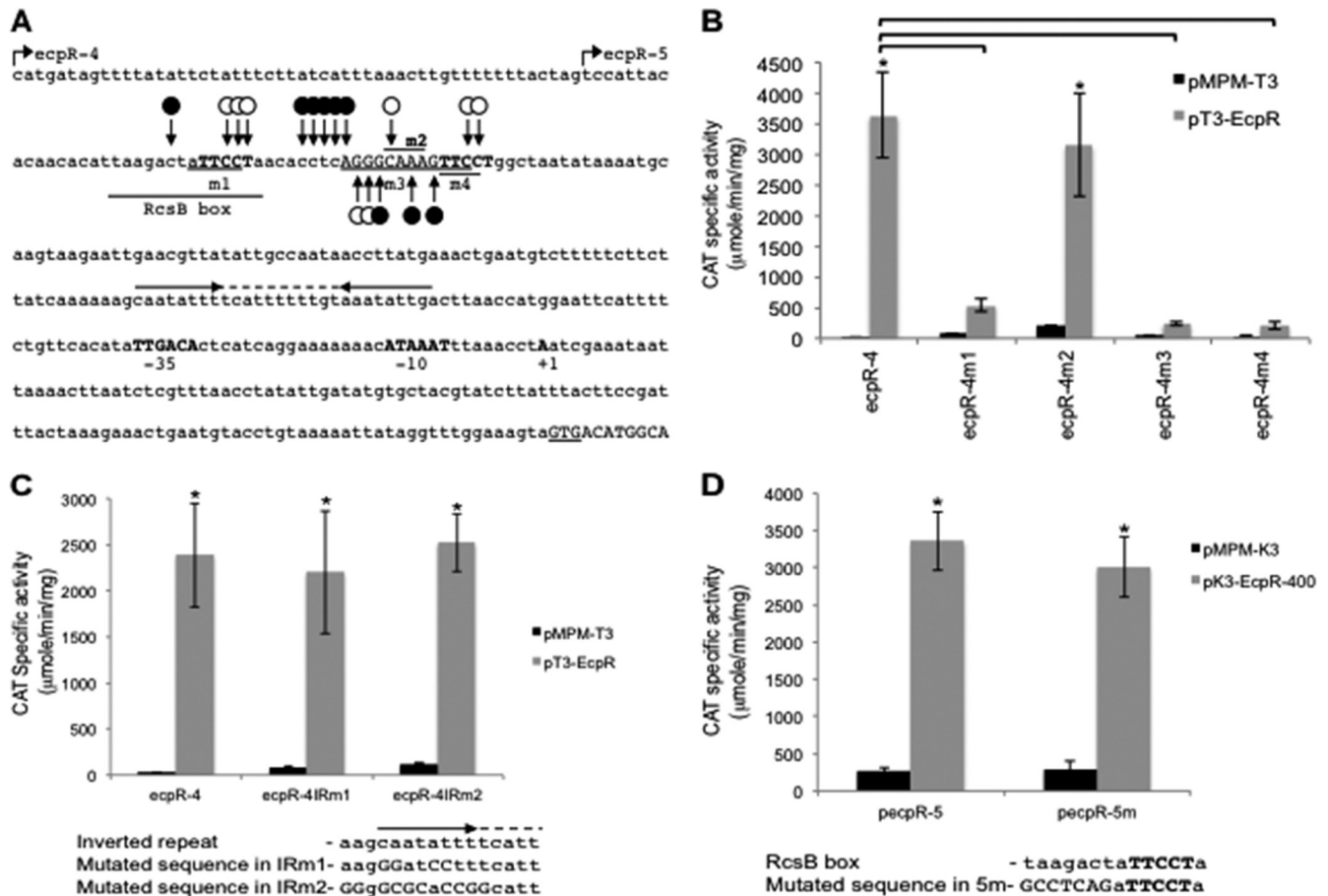
**FIG 5** Identification of the EcpR-binding site. (A to C) *In vivo* DMS footprinting analysis of the EHEC *ecp* regulatory region. Bacterial cultures of EHEC EDL933  $\Delta$ *ecpR* containing fusion *ecpR*-4 (A and B) or *ecpR*-4m2 (C) plus either the empty vector pMPM-T3 (lanes 1) or plasmids expressing wild-type EcpR (pT3-EcpR, lanes 2) or the EcpR K186A inactive mutant (pT3-EcpR-K186A, lanes 3) were exposed to DMS, and the plasmid DNA was extracted and treated as described in Materials and Methods. Primer extension products were amplified with primers pKK-8-BHI (A and C) and *ecpR*-3R (B) and resolved by 7% polyacrylamide–8 M urea gel electrophoresis and visualized by autoradiography. White circles and black circles indicate protected and hypermethylated sites, respectively. Black vertical bars on the left side indicate the bases spanning the putative EcpR-binding sites. The sequencing ladder was obtained with the same primers.

to the wild-type strain. In contrast, the expression of fusions *ecpR*-8, *ecpR*-9 and *ecpR*-10 was not significantly different between the wild-type and  $\Delta$ *ecpR* strains, suggesting that a putative sequence motif required for EcpR-mediated activation was located between positions  $-236$  to  $-186$  with respect to the transcriptional start site (Fig. 4A and C).

When the expression of representative transcriptional fusions was analyzed in the EHEC  $\Delta$ *ecpR* strain carrying vector pMPM-K3 or plasmid pK3-EcpR-400 (expressing EcpR), a very dramatic increase in expression was observed for fusions *ecpR*-4 and *ecpR*-5 (between 33- and 13-fold), but not for the shorter fusions, whose activity was not altered by EcpR (Fig. 4B). This effect was also seen for *ecpR*-6 (Table 1), which was constructed to further delimit the sequence involved in EcpR-mediated activation. Taken together, these results indicate that EcpR positively regulates its own expression, and thus of all the *ecp* genes that are transcribed as an operon, by most likely interacting with a sequence motif located downstream of position  $-211$ .

**EcpR binds to two small direct repeats distantly located with respect to the *ecp* promoter.** The body of evidence above strongly supports a role of EcpR as a positive regulator. To further characterize the interaction of EcpR with the *ecp* regulatory region, we performed *in vivo* methylation interference footprinting experiments. Cultures of EHEC  $\Delta$ *ecpR* carrying fusion *ecpR*-4 plus ei-

ther the empty vector pMPM-T3 or plasmids expressing wild-type EcpR (pT3-EcpR) or the inactive mutant EcpR K186A (pT3-EcpR-K186A) carrying a mutation in the putative HTH DNA-binding domain (Fig. 2) were treated with DMS prior to plasmid DNA purification. Figure 5A shows the primer extension products of the *ecpR* regulatory region spanning the proposed EcpR-binding sequence at the bottom strand. Comparison of the intensities of the products showed that when wild-type EcpR is present (Fig. 5A, lane 2), residues at positions  $-186$ ,  $-187$ ,  $-194$  and  $-207$  to  $-209$ , with respect to the transcriptional start site, were protected from methylation. Other residues between positions  $-198$  to  $-202$  were hypermethylated when wild-type EcpR was present. In contrast, the EcpR K186A mutant (Fig. 5A, lane 3) did not change the methylation pattern of this sequence with respect to the control (Fig. 5A, lane 1). The methylation pattern at the top strand was also analyzed (Fig. 5B). In this case, changes in the methylation pattern were also seen in the presence of wild-type EcpR around the proposed binding sequence between positions  $-197$  to  $-199$  (lane 2) but not in the presence of the empty vector or the plasmid expressing the EcpR K186A mutant (lanes 1 and 3, respectively). Bases protected by EcpR are contained within two TTCCT direct repeats separated by a 17-bp spacer where several bases were hypermethylated in the presence of EcpR (Fig. 6A). To determine the role of these sequence elements in EcpR-mediated



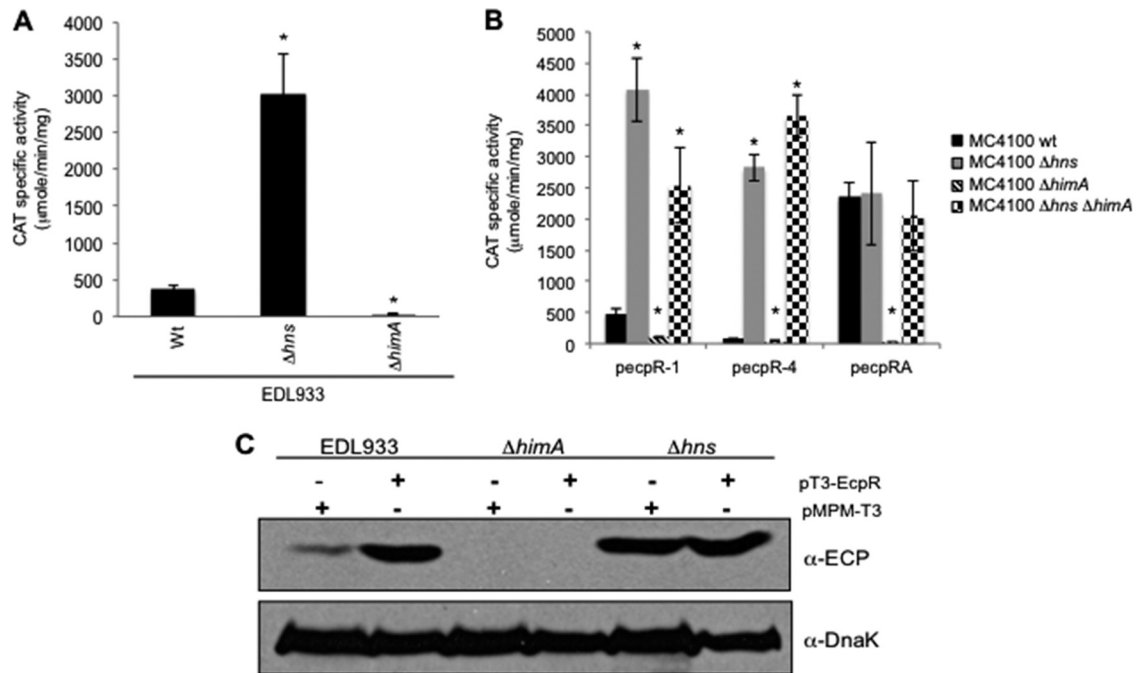
**FIG 6** Analysis of *ecp* regulatory elements by site-directed mutagenesis. (A) Sequence of the regulatory region of *ecp*. The *EcpR* start codon (GTG) is underlined. The transcriptional start site, the  $-10$  and  $-35$  hexamers, and the putative binding sites for *EcpR*, corresponding to the TTCCT boxes, are indicated in bold uppercase letters. The bases changed in mutants *ecpR-4m1* to *ecpR-4m4* are underlined, as well as the RcsB box. The broken arrows represent the 5' limit of the *ecpR-4* and *ecpR-5* fusions at positions  $-288$  and  $-236$ , respectively. Black circles represent the hypermethylated bases observed by *in vivo* footprinting, while white circles represent protected bases. The horizontal arrows indicate the locations of an inverted repeat, and the dashed line indicates the 11-bp spacer. (B) Analysis of the TTCCT boxes. CAT activity of fusions *ecpR-4*, *ecpR-4m1*, *ecpR-4m2*, *ecpR-4m3*, and *ecpR-4m4*. Changes in each mutant fusion are indicated in panel A. (C) Analysis of the inverted repeats. CAT activity of fusions *ecpR-4*, *ecpR-4IRm1* and *ecpR-4IRm2*. The wild-type and mutant sequences of the region spanning the left arm of the inverted repeat are shown below. (D) Analysis of the RcsB box. CAT activity of fusions *pecpR-5* and *pecpR-5m*. The wild-type and mutant sequences of the RcsB box are shown below. The bases changed in fusion *pecpR-5m* are indicated with capital letters. CAT activity was determined from culture samples of EHEC EDL933  $\Delta$ *ecpR* complemented with the empty vector pMPP-T3 (B and C) or pMPP-K3 (D) or plasmid pT3-EcpR (B and C) or pK3-EcpR-400 (D) plus the different transcriptional fusions. The activity is the result of three independent experiments done in duplicate. Asterisks (\*) correspond to  $P$  values of  $<0.0001$  between gray and black bars. Brackets correspond to  $P$  values of  $<0.0001$  between gray bars.

activation, mutant fusions *ecpR-4m1* to *ecpR-4m4* were generated (Fig. 6A and Table 1) and their activities tested in the presence of *EcpR* (Fig. 6B). Interestingly, fusions containing changes that modified the TTCCT boxes (*ecpR-4m1*, *ecpR-4m3*, and *ecpR-4m4*) no longer responded to *EcpR*, while changes in the spacer region between the two TTCCT boxes (*ecpR-4m2*) (Fig. 6B), in an inverted repeat located between the proximal TTCCT box and the promoter (*ecpR-4IRm1* and *ecpR-4IRm2*) (Fig. 6C) or in the sequence right upstream of the distal TTCCT box (*ecpR-5m*) (Fig. 6D), corresponding to the first half of the recently reported RcsB-binding sequence in the *ecp* operon of meningitis *E. coli* (40), did not affect *EcpR*-mediated activation.

These results suggested that upon *EcpR* binding to the TTCCT boxes, which are protected from methylation, the topology of the spacer sequence, which does not seem to be required for *EcpR* binding, is altered, exposing it to hypermethylation. Consistent

with this notion, the spacer sequence of fusion *ecpR-4m2* containing four changes was also hypermethylated without affecting *EcpR* binding to the TTCCT boxes (Fig. 5C) or its activation by *EcpR* (Fig. 6B). Our finely tuned mapping approach revealed that the putative *EcpR*-binding sites are distantly located from the promoter between positions  $-211$  and  $-185$ , at a noncanonical distance for LuxR-like regulators.

**IHF counteracts the repression exerted by H-NS and is essential for *EcpR* activity.** The regulation of fimbrial operons often involves, in addition to the elements encoded within the operon, global regulators such as IHF and H-NS (14). In order to determine if global regulators were also involved in *ecp* activation, we analyzed the activity of fusion *ecpR-1* in EPEC E2348/69 and its  $\Delta$ *hns*,  $\Delta$ *fis*,  $\Delta$ *hha*,  $\Delta$ *himA*, and  $\Delta$ *stpA* derivative mutant strains (Table 1). No difference was observed between the wild-type strain and the  $\Delta$ *fis*,  $\Delta$ *hha*, and  $\Delta$ *stpA* mutants (see Fig. S2A in the



**FIG 7** Global regulators IHF and H-NS regulate *ecp* expression. (A) CAT activities of fusion *ecpR*-1 in wild-type EHEC EDL933 and its  $\Delta hns$  and  $\Delta himA$  isogenic mutants. \*,  $P$  values of  $<0.0001$ . (B) CAT activity assay with *E. coli* K-12 strain MC4100 and its  $\Delta hns$ ,  $\Delta himA$ , and  $\Delta himA \Delta hns$  isogenic mutants transformed with fusions *ecpR*-1, *ecpR*-4, and *ecpRA*. Error bars indicate standard deviations of results from three independent experiments with duplicates. \*,  $P$  values of  $<0.0001$  between wild-type and mutant strains, calculated using the unpaired Student  $t$  test. (C) Western blot with the anti-ECP antibody of whole-cell extracts of EHEC EDL933 and its  $\Delta hns$  and  $\Delta himA$  isogenic mutants transformed with vector pMPM-T3 or plasmid pT3-EcpR (Table 1). DnaK was detected as a loading control using a monoclonal anti-DnaK antibody.

supplemental material). In contrast, in the  $\Delta hns$  and  $\Delta himA$  mutants, a significant increase and reduction, respectively, in *ecp* promoter activation was observed, indicating that H-NS and IHF regulate negatively and positively, respectively, the expression of the *ecp* promoter (Fig. S2A). These results were further confirmed in EHEC EDL933 and its  $\Delta hns$  and  $\Delta himA$  isogenic mutants (Table 1). A 7-fold increase in activity was observed in the *hns* mutant, while in the  $\Delta himA$  strain the activity was 16 times lower than in the wild-type strain (Fig. 7A).

In order to confirm the role of IHF and to determine if EcpR is acting in synergy with it to regulate the expression of the *ecp* operon, we analyzed the level of EcpA production by Western blotting using whole-cell extracts of wild-type EHEC EDL933 and its  $\Delta hns$  and  $\Delta himA$  mutants transformed with the empty vector pMPM-T3 or with plasmid pT3-EcpR expressing EcpR (Fig. 7C). As expected, an increase in EcpA production in EHEC/pT3-EcpR (lane 2) was observed compared to EHEC/pMPM-T3 (lane 1). In the  $\Delta himA$  mutant the production of EcpA was abolished, whether transformed with the empty vector or plasmid pT3-EcpR (lanes 3 and 4, respectively), indicating that IHF is essential for the EcpR-dependent activation of the *ecp* promoter. In contrast, in the *hns* mutant similar production of EcpA was detected, regardless of the presence of the vector or the pT3-EcpR plasmid (lanes 5 and 6, respectively), confirming the role of H-NS as a repressor of *ecp* expression. The same expression pattern was seen in EPEC and its  $\Delta himA$  and  $\Delta hns$  mutant derivatives (Fig. S2B).

To get insights into the mechanism by which IHF positively regulates the expression of *ecp*, fusions *ecpR*-1, *ecpR*-4, and *ecpRA* were transformed into the wild-type *E. coli* K-12 strain MC4100

and its  $\Delta hns$ ,  $\Delta himA$  and  $\Delta himA/\Delta hns$  mutants (Table 1), which we have previously shown are a suitable host to use to study the interplay between H-NS and IHF in the transcriptional regulation of EPEC virulence genes (10). This strain lacks the *ecp* operon, as seen by PCR with primers specific for *ecpR* and *ecpA* (data not shown). The expression of fusions *ecpR*-1 and *ecpR*-4 increased approximately 8 and 36 times, respectively, in the *hns* mutant (Fig. 7B), similar to what was observed in EHEC and EPEC (Fig. 7A and see Fig. S2A in the supplemental material, respectively). However, in the *himA* mutant, the expression of these fusions decreased to background levels, as seen in EHEC and EPEC  $\Delta himA$  strains (Fig. 7A and S2A, respectively). In contrast, the activities of both fusions in the *himA hns* double mutant were similar to the activities obtained in the *hns* single mutant, suggesting that the function of IHF is to regulate positively the expression of the *ecp* operon by counteracting the repression exerted by H-NS. On the other hand, the *ecpRA* fusion, which contains the *ecpR* gene and thus expresses EcpR, showed an activity in the wild-type strain approximately 30 times higher than the activity of the *ecpR*-4 fusion (both fusions contain up to position  $-288$  of the *ecpR* regulatory region with respect to the transcriptional start site), further confirming the role of EcpR as a positive regulator. The activity obtained in the *hns* mutant was similar to that obtained in the wild-type strain, suggesting that the role of EcpR is also to counteract, with the aid of IHF, the repression exerted by H-NS. In contrast, the activity in the *himA* mutant was completely abolished, further supporting that IHF is essential for the EcpR-mediated activation of the *ecp* promoter; however, in the *himA hns* double mutant the fusion's activity was similar to that obtained in the wild-type and  $\Delta hns$

strains, indicating that when H-NS is absent, both IHF and EcpR are no longer required.

## DISCUSSION

The regulation of ECP is just starting to be elucidated. The aim of this work was to analyze the transcriptional regulation of the *ecp* operon, as well as to study the role of EcpR, the product of the first gene. Analogous to other pilus systems, we found that the genes constituting the *ecp* cluster are transcribed as an operon and that EcpR is a positive regulator resembling the organization of other fimbrial operons, in which the first gene encodes a protein involved in their transcriptional regulation. For example, the *pap* operon, in which the *papB* regulator is transcribed along with the *papA* pilin (4), although there is no similarity between the pilin subunits or the regulators.

EcpR, also known as MatA, belongs to the superfamily of proteins containing a LuxR\_C-like DNA-binding HTH domain (2). Many members of this family are canonical response regulators activated by sensor histidine kinases (e.g., members of the NarL/FixJ subfamily) (25), but others respond to different regulatory molecules. In these cases, the N-terminal domain modulates the activity of the C-terminal domain by means of several modifications in response to different environmental cues. For example, some proteins, like LuxR of *Vibrio fischeri*, bind quorum-sensing signaling molecules on their N-terminal domain (28); others, like *E. coli* NarL (21) and *Sinorhizobium meliloti* FixJ (1, 58), are phosphorylated at a conserved Asp residue; *E. coli* MalT binds maltotriose (56) and ATP (59); and GerE is the smallest member of the family lacking an N-terminal domain (20). Interestingly, the N terminus of EcpR does not share similitude with any of these proteins, nor contains any conserved functional domains, and thus represents a novel member of this protein family.

Despite the conservation of several C-terminal amino acid residues with response regulators of the NarL/FixJ subfamily and of a putative phosphoacceptor aspartic acid residue (D60), EcpR lacks most of the key N-terminal residues of the active site of canonical receiver domains. In agreement with this observation, the EcpR D60A mutant was not affected in its ability to activate the expression of the *ecp* promoter or to induce the synthesis of EcpA (Fig. 2). In contrast, the corresponding residue in the nitrate response regulator NarL (D59) was shown to be essential for its activity (21).

It has been shown for LuxR that truncated versions of the protein containing the HTH domain, but not the autoinducer-binding domain, are still active and no longer autoinducer dependent (13), this being the reason why it has been proposed that the N terminus interferes with the DNA-binding activity of the HTH domain in the absence of the inducer. In the case of EcpR, we constructed three truncated versions of the protein (named EcpR  $\Delta$ N85,  $\Delta$ N110, and  $\Delta$ N129); however, none of them was able to complement *ecp* activation (data not shown), suggesting that EcpR, in contrast to LuxR, does not possess a modular structure and has to be intact to be functional.

The predicted HTH domain of EcpR is most likely involved in DNA binding, since two mutants, EcpR V176A and K186A, carrying alanine substitutions in two highly conserved residues at the putative recognition helix, were inactive. Furthermore, the K186A mutant was shown by *in vivo* footprinting to be unable to occupy the EcpR putative binding boxes that were shown by deletion and site-directed mutagenesis to be essential for the EcpR-dependent

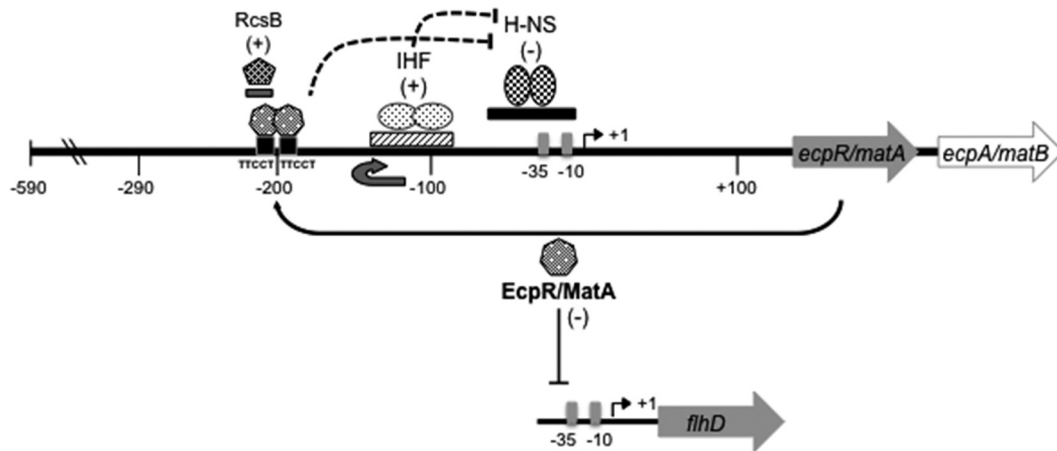
activation of the *ecp* promoter. In agreement with this observation, a mutation of the corresponding K198 residue in NarL also generated a defective mutant (42). Interestingly, the EcpR T175A mutant did not have a phenotype even when this residue was also highly conserved in the recognition helix of different LuxR-like regulators, suggesting that slight modifications in this helix may determine specificity for its unique binding sequence. However, at least for GerE of *Bacillus subtilis*, this residue has been shown to be important for transcriptional activation (15).

Representative members of this family have been shown to form dimers and to interact with inverted repeat sequences of different lengths. Such is the case for EsaR from *Pantoea stewartii* (46) and ExpR from *Erwinia chrysanthemi* (49), among others. LuxR family regulators may share a similar organization of their target binding sites (72). For example, LuxR dimers bind the *lux* box, a 20-bp inverted repeat (67), TraR binds to a 18-bp inverted repeat (75), GerE dimers bind two 12-bp consensus sequences in an inverted orientation with the central four bases overlapping (15, 20), and the NarL dimer binds two 7-bp inverted repeats separated by 2 bp (16). In contrast, EcpR seems to bind to two 5-bp direct repeats, the TTCCT boxes, separated by 17 bp, which are located between positions  $-211$  and  $-185$  with respect to the transcriptional start site at a noncanonical distance from the *ecp* promoter. Each TTCCT box is individually essential for the EcpR-mediated activation of the *ecp* promoter, suggesting that EcpR may bind to them as a dimer.

Furthermore, the distant location of the putative EcpR target TTCCT boxes upstream of position  $-185$  suggested that EcpR might require additional regulatory elements to influence the activation of the *ecp* promoter. In agreement with this notion, the global heterodimeric regulator IHF was identified as an essential element for the activation of the *ecp* promoter, suggesting that it is required to generate the appropriate structural changes (e.g., by DNA looping) at the *ecp* regulatory region to facilitate the interaction of EcpR with the promoter and/or to disrupt or prevent the formation of repressor complexes by H-NS, which was found to strongly repress *ecp* expression. Global regulators such as IHF and H-NS have been shown to be involved in the transcriptional regulation of different fimbrial operons, which are also regulated by specific regulatory proteins belonging to different protein families (14).

Although the interplay between H-NS, IHF and the LuxR\_C-like protein EcpR seems to represent a novel scheme in fimbrial regulation, some models of the complex interaction between members of the LuxR\_C-like superfamily and global regulators such as IHF are starting to emerge. For example, the quorum-sensing regulator SmcR of *Vibrio vulnificus* binds to a distant sequence motif located around position  $-196$  upstream from the *vvpE* gene coding for elastase and requires IHF to get closer to the promoter (33). The response regulator NarL, together with FNR, was shown to counteract IHF and Fis repression, but not H-NS, on the *E. coli nir* promoter (8); however, IHF can also act as a positive regulator of the *nir* promoter depending on the position of its binding sites (9). *Vibrio harveyi* LuxR binds to a distant site on the *lux* operon, although it has not been reported whether IHF aids in the activation of this promoter (68). Future studies are required to establish if additional regulatory proteins participate in the control of the *ecp* operon or if EcpR binds to an effector molecule to undergo structural changes that render a more effective EcpR protein *in vivo*. In this regard, it was recently reported





**FIG 8** Transcriptional regulation of the *ecp* (*mat*) operon. *ecp* (*mat*) codes for EcpR/MatA, a regulatory protein containing a LuxR\_C-like DNA-binding HTH domain that regulates positively the expression of the *ecp* operon by binding to two TTCCT boxes distantly located at positions  $-211$  to  $-207$  (distal box) and  $-189$  to  $-185$  (proximal box) with respect to the TSS. EcpR and IHF, which most likely bends the DNA between the TTCCT boxes and the promoter to get EcpR into close proximity to the promoter, counteract the repression exerted by H-NS on the *ecp* (*mat*) promoter. In addition, the response regulator RcsB also positively regulates the *ecp* (*mat*) promoter by binding to a sequence that overlaps the distant TTCCT box (40). EcpR/MatA also acts as a negative regulator by repressing the expression of the flagellar master operon *flhDC* (39).

that the *ecp* (*mat*) promoter in meningitis-causing *E. coli* is regulated by the response regulator RcsB by interacting with a sequence motif that overlaps the distal TTCCT box (40) (Fig. 8). Further work is needed to determine the potential interplay between EcpR and RcsB during *ecp* transcriptional activation and also to define whether RcsB is equally essential for *ecp* activation in A/E pathogens since mutations in the putative RcsB-binding sequence that did not modify the TTCCT distal box or a deletion of the first half of this site did not affect EcpR-mediated activation of the *ecp* promoter. This will be particularly important considering that the *ecp* operon may be differentially regulated between *E. coli* pathotypes, as illustrated by the fact that while ECP is expressed in A/E *E. coli* even at 37°C (57, 61), in the MNEC strain expression is observed only at 20°C (40, 53) and no expression was detected for *E. coli* MG1655 (38).

The *ecp* operon has distinctive features that make it a very interesting model of study. In addition to having genes encoding a second pilin-like protein and a second chaperone (26, 38, 53, 57), it is regulated by an atypical LuxR/NarL/FixJ-like protein, EcpR, which recognizes two distant 5-bp direct repeats that do not resemble the dyad symmetry of most binding sites recognized by other members of the family. In addition, activation of the *ecp* promoter requires IHF, which together with EcpR efficiently overcome the repression exerted by H-NS (Fig. 8). In summary, here we describe the elements that are involved in the transcriptional regulation of *ecp* and the role of a novel member of the protein family containing the LuxR\_C-like DNA-binding HTH domain.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (60796 and 154287) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN227410) to J.L.P. and by grant number AI66012 from NIAID, NIH, to J.A.G. V.I.M.-S. and A.M.-L. were supported by scholarships from CONACyT (166620 and 173678, respectively).

We thank A. L. Erdem and M. A. Rendón for the RT-PCR analysis and their input at the early stages of this work and A. Vázquez, F. J. Santana

and M. Fernández-Mora for excellent technical assistance. We are grateful to K. Juárez for experimental advice.

#### REFERENCES

1. Agron PG, Ditta GS, Helinski DR. 1993. Oxygen regulation of *nifA* transcription *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:3506–3510.
2. Aravind L, Anantharaman V, Balaji S, Babu MM, Iyer LM. 2005. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. FEMS Microbiol. Rev. 29:231–262.
3. Avelino F, et al. 2010. The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the *E. coli* common pilus when adhering to cultured epithelial cells. Int. J. Med. Microbiol. 300:440–448.
4. Baga M, Goransson M, Normark S, Uhlin BE. 1985. Transcriptional activation of a *pap* pilus virulence operon from uropathogenic *Escherichia coli*. EMBO J. 4:3887–3893.
5. Barba J, et al. 2005. A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. J. Bacteriol. 187:7918–7930.
6. Blackburn D, et al. 2009. Distribution of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic *E. coli*. J. Clin. Microbiol. 47:1781–1784.
7. Blomfield IC, Calie PJ, Eberhardt KJ, McClain MS, Eisenstein BI. 1993. Lrp stimulates phase variation of type 1 fimbriation in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 175:27–36.
8. Browning DF, Cole JA, Busby SJ. 2000. Suppression of FNR-dependent transcription activation at the *Escherichia coli* *nir* promoter by Fis, IHF and H-NS: modulation of transcription initiation by a complex nucleoprotein assembly. Mol. Microbiol. 37:1258–1269.
9. Browning DF, Cole JA, Busby SJ. 2008. Regulation by nucleoid-associated proteins at the *Escherichia coli* *nir* operon promoter. J. Bacteriol. 190:7258–7267.
10. Bustamante VH, et al. 2011. PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 82:398–415.
11. Campellone KG. 2010. Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Tir, EspFU and actin pedestal assembly. FEBS J. 277:2390–2402.
12. Casadaban MJ. 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.
13. Choi SH, Greenberg EP. 1991. The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent *lux* gene activating domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88:11115–11119.
14. Clegg S, Wilson J, Johnson J. 2011. More than one way to control hair

- growth: regulatory mechanisms in enterobacteria that affect fimbriae assembled by the chaperone/usher pathway. *J. Bacteriol.* 193:2081–2088.
15. Crater DL, Moran CP Jr. 2001. Identification of a DNA binding region in GerE from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183:4183–4189.
  16. Darwin AJ, Tyson KL, Busby SJ, Stewart V. 1997. Differential regulation by the homologous response regulators NarL and NarP of *Escherichia coli* K-12 depends on DNA binding site arrangement. *Mol. Microbiol.* 25:583–595.
  17. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:6640–6645.
  18. Donnenberg MS, et al. 1993. Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J. Clin. Invest.* 92:1412–1417.
  19. Doughty S, et al. 2002. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 70:6761–6769.
  20. Ducros VM, et al. 2001. Crystal structure of GerE, the ultimate transcriptional regulator of spore formation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 306:759–771.
  21. Egan SM, Stewart V. 1991. Mutational analysis of nitrate regulatory gene *narL* in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 173:4424–4432.
  22. Eisenstein BI, Sweet DS, Vaughn V, Friedman DI. 1987. Integration host factor is required for the DNA inversion that controls phase variation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84:6506–6510.
  23. Finlay BB, Falkow S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:136–169.
  24. Gally DL, Rucker TJ, Blomfield IC. 1994. The leucine-responsive regulatory protein binds to the *fim* switch to control phase variation of type 1 fimbrial expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 176:5665–5672.
  25. Gao R, Mack TR, Stock AM. 2007. Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem. Sci.* 32:225–234.
  26. Garnett JA, et al. 2012. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:3950–3955.
  27. Giron JA, Ho AS, Schoolnik GK. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254:710–713.
  28. Hanzelka BL, Greenberg EP. 1995. Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. *J. Bacteriol.* 177:815–817.
  29. Hernandez RT, et al. 2011. Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:8391–8399.
  30. Holden NJ, Gally DL. 2004. Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. *J. Med. Microbiol.* 53:585–593.
  31. Humphries AD, et al. 2003. The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial operons. *Mol. Microbiol.* 48:1357–1376.
  32. Humphries RM, Armstrong GD. 2010. Sticky situation: localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to the small intestine epithelium. *Future Microbiol.* 5:1645–1661.
  33. Jeong HS, Kim SM, Lim MS, Kim KS, Choi SH. 2010. Direct interaction between quorum-sensing regulator SmcR and RNA polymerase is mediated by integration host factor to activate *vvpE* encoding elastase in *Vibrio vulnificus*. *J. Biol. Chem.* 285:9357–9366.
  34. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* i:619–620.
  35. Kim SH, Kim YH. 2004. *Escherichia coli* O157:H7 adherence to HEp-2 cells is implicated with curli expression and outer membrane integrity. *J. Vet. Sci.* 5:119–124.
  36. Klemm P. 1986. Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 5:1389–1393.
  37. Lasaro MA, et al. 2009. F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:246–251.
  38. Lehti TA, et al. 2010. Mat fimbriae promote biofilm formation by meningitis-associated *Escherichia coli*. *Microbiology* 156:2408–2417.
  39. Lehti TA, Bauchart P, Dobrindt U, Korhonen TK, Westerlund-Wikstrom B. 2012. The fimbriae activator MatA switches off motility in *Escherichia coli* by repression of the flagellar master operon *flhDC*. *Microbiology* 158:1444–1455.
  40. Lehti TA, Heikkinen J, Korhonen TK, Westerlund-Wikstrom B. 2012. The response regulator RcsB activates expression of Mat fimbriae in meningitic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 194:3475–3485.
  41. Levine MM, et al. 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.
  42. Lin AV, Stewart V. 2010. Functional roles for the GerE-family carboxyl-terminal domains of nitrate response regulators NarL and NarP of *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* 156:2933–2943.
  43. Low AS, et al. 2006. Cloning, expression, and characterization of fimbrial operon F9 from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 74:2233–2244.
  44. Martínez-Laguna Y, Calva E, Puente JL. 1999. Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 33:153–166.
  45. Mayer MP. 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* 163:41–46.
  46. Minogue TD, Wehland-von Trebra M, Bernhard F, von Bodman SB. 2002. The autoregulatory role of EsaR, a quorum-sensing regulator in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*: evidence for a repressor function. *Mol. Microbiol.* 44:1625–1635.
  47. Mol O, Oudega B. 1996. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 19:25–52.
  48. Morett E, Fischer HM, Hennecke H. 1991. Influence of oxygen on DNA binding, positive control, and stability of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA regulatory protein. *J. Bacteriol.* 173:3478–3487.
  49. Nasser W, Bouillant ML, Salmoud G, Reverchon S. 1998. Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* *expI-expR* locus directing the synthesis of two N-acyl-homoserine lactone signal molecules. *Mol. Microbiol.* 29:1391–1405.
  50. Nasser W, Reverchon S. 2007. New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Anal. Bioanal. Chem.* 387:381–390.
  51. Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142–201.
  52. Nicholls L, Grant TH, Robins-Browne RM. 2000. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 35:275–288.
  53. Poultu R, et al. 2001. *matB*, a common fimbriin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. *J. Bacteriol.* 183:4727–4736.
  54. Proft T, Baker EN. 2009. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:613–635.
  55. Puente JL, Bieber D, Ramer SW, Murray W, Schoolnik GK. 1996. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol. Microbiol.* 20:87–100.
  56. Raibaud O, Richet E. 1987. Maltotriose is the inducer of the maltose regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169:3059–3061.
  57. Rendon MA, et al. 2007. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:10637–10642.
  58. Reytrat JM, David M, Blonski C, Boistard P, Batut J. 1993. Oxygen-regulated in vitro transcription of *Rhizobium meliloti* *nifA* and *fixK* genes. *J. Bacteriol.* 175:6867–6872.
  59. Richet E, Raibaud O. 1989. MalT, the regulatory protein of the *Escherichia coli* maltose system, is an ATP-dependent transcriptional activator. *EMBO J.* 8:981–987.
  60. Riley LW, et al. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681–685.
  61. Saldana Z, et al. 2009. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. *J. Bacteriol.* 191:3451–3461.
  62. Saldana Z, et al. 2009. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environ. Microbiol.* 11:992–1006.
  63. Saldana Z, Sanchez E, Xicohtencatl-Cortes J, Puente JL, Giron JA. 2011.

- Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7. *Front. Microbiol.* **2**:119.
64. Samadder P, et al. 2009. The *Escherichia coli* *ycbQRST* operon encodes fimbriae with laminin-binding and epithelial cell adherence properties in Shiga-toxigenic *E. coli* O157:H7. *Environ. Microbiol.* **11**:1815–1826.
  65. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**:5463–5467.
  66. Soto GE, Hultgren SJ. 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* **181**:1059–1071.
  67. Stevens AM, Dolan KM, Greenberg EP. 1994. Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the *lux* promoter region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:12619–12623.
  68. Swartzman E, Meighen EA. 1993. Purification and characterization of a poly(dA-dT) *lux*-specific DNA-binding protein from *Vibrio harveyi* and identification as LuxR. *J. Biol. Chem.* **268**:16706–16716.
  69. Tarr PI, et al. 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect. Immun.* **68**:1400–1407.
  70. Torres AG, et al. 2002. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **70**:5416–5427.
  71. Torres AG, et al. 2006. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* O157:H7 stimulates dendritic cell activation. *Infect. Immun.* **74**:2676–2685.
  72. Tsai CS, Winans SC. 2010. LuxR-type quorum-sensing regulators that are detached from common scents. *Mol. Microbiol.* **77**:1072–1082.
  73. van der Woude MW, Braaten BA, Low DA. 1992. Evidence for global regulatory control of pilus expression in *Escherichia coli* by Lrp and DNA methylation: model building based on analysis of *pap*. *Mol. Microbiol.* **6**:2429–2435.
  74. Van Houdt R, Michiels CW. 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.* **156**:626–633.
  75. White CE, Winans SC. 2007. The quorum-sensing transcription factor TraR decodes its DNA binding site by direct contacts with DNA bases and by detection of DNA flexibility. *Mol. Microbiol.* **64**:245–256.
  76. White-Ziegler CA, Angus Hill ML, Braaten BA, van der Woude MW, Low DA. 1998. Thermoregulation of *Escherichia coli* *pap* transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor. *Mol. Microbiol.* **28**:1121–1137.
  77. Xicohtencatl-Cortes J, et al. 2007. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Clin. Invest.* **117**:3519–3529.

# Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus

James A. Garnett<sup>a</sup>, Verónica I. Martínez-Santos<sup>b</sup>, Zeus Saldaña<sup>c</sup>, Tillmann Pape<sup>a</sup>, William Hawthorne<sup>a</sup>, Jennifer Chan<sup>a</sup>, Peter J. Simpson<sup>a</sup>, Ernesto Cota<sup>a</sup>, José L. Puente<sup>b</sup>, Jorge A. Girón<sup>c,1</sup>, and Steve Matthews<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Centre for Structural Biology, Department of Biological Sciences, Imperial College London, South Kensington, London SW7 2AZ, United Kingdom; <sup>b</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62210, México; and <sup>c</sup>Emerging Pathogens Institute, Department of Molecular Genetics and Microbiology, University of Florida, Gainesville, FL 32610

Edited by Scott J. Hultgren, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, and approved January 24, 2012 (received for review May 4, 2011)

**Bacteria have evolved a variety of mechanisms for developing community-based biofilms. These bacterial aggregates are of clinical importance, as they are a major source of recurrent disease. Bacterial surface fibers (pili) permit adherence to biotic and abiotic substrates, often in a highly specific manner. The *Escherichia coli* common pilus (ECP) represents a remarkable family of extracellular fibers that are associated with both disease-causing and commensal strains. ECP plays a dual role in early-stage biofilm development and host cell recognition. Despite being the most common fimbrial structure, relatively little is known regarding its biogenesis, architecture, and function. Here we report atomic-resolution insight into the biogenesis and architecture of ECP. We also derive a structural model for entwined ECP fibers that not only illuminates interbacteria communication during biofilm formation but also provides a useful foundation for the design of novel nanofibers.**

chaperone-usher | donor-strand exchange | X-ray crystallography

The long coexistence between bacteria and their eukaryote hosts has fine-tuned their relationships. These microorganisms have developed remarkable molecular systems for the trafficking of molecules across the cell envelope and exchanging signals with their environment. Historically, bacteria have been studied during their planktonic life cycle, although a matrix-enclosed, organized-community lifestyle is a frequent mode of growth for countless species that exist in diverse environments. Many bacteria produce surface fibers allowing them to adhere to each other and to biotic and abiotic surfaces (1, 2). Furthermore, many of these fibers are able to recognize specific host cell receptors during the first steps of host colonization and subsequent biofilm formation (3). These bacterial aggregates are of clinical importance, as they are a major source of recurrent disease allowing reservoirs of bacteria to persist in a host or the environment. Biofilms also contribute to increased resistance to antibiotics, the immune system, and host clearance mechanisms (4).

*Escherichia coli* are primarily commensal colonizers of the human and other animal bowels, contributing to a healthy host immune system. Conversely, there are a number of virulent strains that are important causative agents of many diarrheal diseases such as hemorrhagic colitis (4). Upon entering extraintestinal sites, pathogenic strains can also lead to neonatal meningitis, urinary tract infections, sepsis, and pneumonia (5). The effects of such gastrointestinal and urinary tract diseases in the developing world are considerable (6), and they are estimated to kill around 2.5 million people every year, mostly young children (7).

The *E. coli* common pilus (ECP), encoded by the *ecpRABCDE* operon, is an extracellular adhesive fiber first documented in association with *E. coli* strains causing newborn meningitis and septicemia (NMEC), where it was originally named the Mat (meningitis-associated and temperature-regulated) fimbriae (8). Further studies, however, have revealed that the *ecp* operon is ubiquitous across *E. coli*, making it the most common fimbrial structure in both commensal and pathogenic strains (8–12). Moreover, this operon is found in many other important pathogenic enterobacteria that thrive in the gastrointestinal and urinary tracts.

Recent research suggests that ECP plays a dual role in early-stage biofilm development and host cell recognition. An *ecp* operon deletion mutant of an NMEC strain was not able to adhere to hydrophobic abiotic surfaces and establish a detectable biofilm (13). In enteropathogenic *E. coli* (EPEC), ECP has been shown to act in synergy with the bundle-forming pilus (BFP) during formation of localized adherence, and antibodies against ECP were able to significantly reduce adhesion of a *bfpA* mutant to epithelial cells (12). ECP has also been implicated as an adherence factor contributing to the aggregative adherence (AA) pattern of enteroaggregative *E. coli* (EAEC) (9). Although aggregative adherence fimbriae (AAF<sub>s</sub>) (14–16) have been shown to be important adhesins involved in AA, the majority of EAEC strains do not produce AAF<sub>s</sub>, but ECP is highly conserved among them (9). ECP production has also been detected in both biofilm-attached and free-living planktonic *E. coli* and, although the details are still unclear, the environmental cues for ECP up-regulation are optimized toward the particular niche environment colonized by the strain (13).

The majority of ECP is composed of a unique ~18-kDa protein called EcpA (8), and immunogold labeling of the pilus, visualized by electron microscopy (EM), identifies EcpA along the entire length of the fibers (10). Furthermore, scanning electron microscopy (SEM) images show that the pili are thin flexible fibers that extend several micrometers away from the bacterial surface and have a high tendency to aggregate into well-ordered parallel and ~12-nm antiparallel superstructures (10), implicating an important role for EcpA in biofilm formation. In this study, we report atomic-resolution insight into the biogenesis and architecture of ECP. Furthermore, our work also provides a structural model for entwined ECP in bacteria–bacteria interactions, such as during biofilm formation and cell adherence.

## Results

**Atomic-Resolution Structure of EcpA.** The major ECP subunit, EcpA, contains a novel primary sequence with no detectable homology to any other pilin or fimbrial subunit with known structure. To determine the biogenesis and atomic details of this system, we began structural studies of EcpA from the uropathogenic *E. coli*

Author contributions: J.A. Garnett, J.L.P., J.A. Girón, and S.M. designed research; J.A. Garnett, V.I.M.-S., Z.S., T.P., W.H., J.C., and P.J.S. performed research; Z.S. and J.L.P. contributed new reagents/analytic tools; J.A. Garnett, V.I.M.-S., Z.S., T.P., W.H., J.C., P.J.S., E.C., J.L.P., J.A. Girón, and S.M. analyzed data; and J.A. Garnett, E.C., J.A. Girón, and S.M. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

Data deposition: The coordinates and structure factors for EcpA and EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup> reported in this paper have been deposited in the Protein Data Bank, [www.pdb.org](http://www.pdb.org) (PDB ID codes 3QS2 and 3QS3, respectively).

<sup>1</sup>To whom correspondence may be addressed. E-mail: [s.j.matthews@imperial.ac.uk](mailto:s.j.matthews@imperial.ac.uk) or [jagiron@ad.ufl.edu](mailto:jagiron@ad.ufl.edu).

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1106733109/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1106733109/-DCSupplemental).

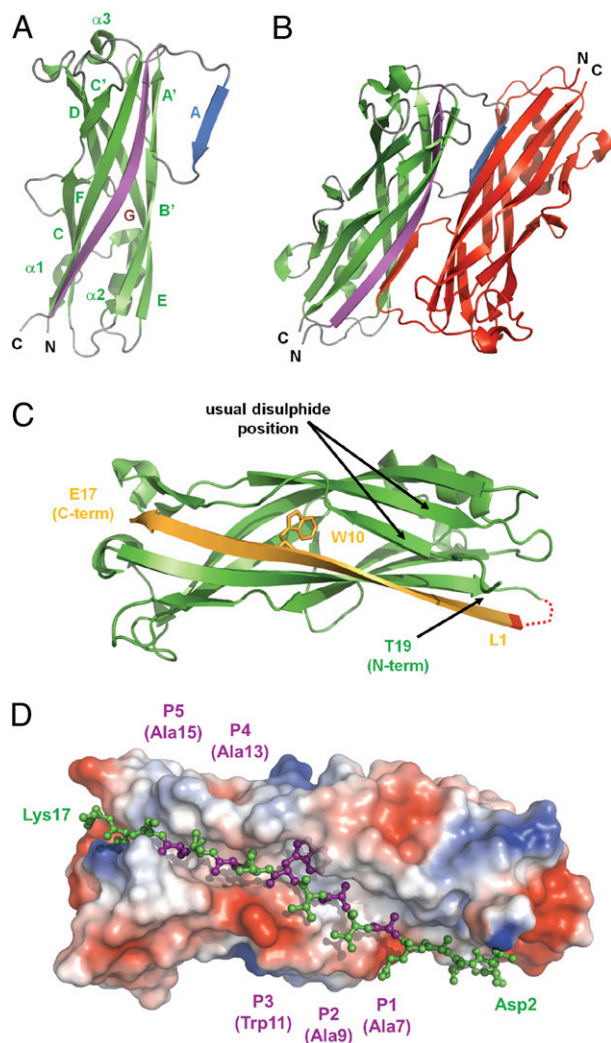
(UPEC) strain *CFT073*. A recombinant EcpA-His<sub>6</sub>-tagged protein containing the 173 amino acids of the mature *ecpA* gene product minus the 22 amino acids of the N-terminal signal sequence was produced in *E. coli* K12 and purified by nickel-affinity and gel-filtration chromatography. EcpA eluted as a dimer, and this was confirmed by NMR relaxation measurements giving an estimated correlation time consistent with a dimeric molecular mass in solution ( $\tau_c \sim 16$  ns at 37 °C).

Crystals were readily obtained and structure determination was undertaken with iodide single wavelength anomalous dispersion (I-SAD) phasing and electron-density maps refined to 1.8 Å (Fig. S1 and Table S1). The final model contains two identical molecules in a head-to-tail arrangement, and all molecules could be built except for the N-terminal His<sub>6</sub> tags. EcpA is made up of seven  $\beta$ -strands and three helices; however, the A strand is flipped-out in both domains and complements the other subunit, forming a highly stable domain-swapped dimer (Fig. 1A and B and Fig. S1). On closer inspection, if the A–A' strand forms without crossing domains, the empty G groove could be donor strand-complemented (DSC) (17–19) by the N-terminal extension (NTE) of an adjacent EcpA molecule within the pilus (Fig. S1), as is observed in the chaperone-usher (CU) pathway family.

The *ecp* operon is composed of six genes: *ecpR*, *ecpA*, *ecpB*, *ecpC*, *ecpD*, and *ecpE*. Primary sequence analysis of EcpR revealed homology with the *E. coli* response regulator NarL (20), whereas examination of EcpB, EcpC, and EcpE using Phyre (21) detected low but significant similarity with a variety of chaperone and usher proteins from the CU family of pili (22). The typical sequence identity is <17% with all known usher (EcpC) and chaperone (EcpB and EcpE) structures (homology model confidence >99.9%). Interestingly, both EcpB and EcpE are predicted to function as chaperones, which is unprecedented in the CU system, where there is usually a single common chaperone. Although sequence analysis of EcpD (~60 kDa) revealed no matches with other proteins (no *E* value <1), inspection of the N termini in EcpA and EcpD showed a significant level of similarity (Fig. S2). These sequences are likely to form donor strands in assembled pili, and their similarity also suggests that EcpA and EcpD interact with each other. Therefore, to create monomeric reagents of EcpA, both the N-terminal 18 residues of EcpA and 17 residues of EcpD were cloned onto the C terminus, with the addition of a short tetrapeptide (SDNK) linker sequence (Fig. S2 and Tables S2 and S3). These constructs (EcpA<sup>19–173</sup>dscA<sup>1–18</sup>, EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup>) were overexpressed in *E. coli* and purified by nickel affinity. Gel-filtration chromatography and NMR analysis confirmed that both constructs form monomeric well-folded structures and indicate that EcpA is able to interact with its own N-terminal strand as well as that of EcpD.

Highly diffracting crystals were obtained for EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup>, and the structure was solved using molecular replacement and electron-density maps refined to 2.1 Å (Fig. S1 and Table S1). The final structure contains 12 EcpA molecules in the asymmetric unit and, although most residues could be modeled, it was not possible to build the N-terminal His<sub>6</sub> tags, Thr19 of chains F, I, and J, Thr20 of chain I, and parts of the solvent-exposed SDNK linker (Asp175–Lys176 chains A and C; Ser174–Lys177 chain J). Six citrate molecules were also modeled in the asymmetric unit.

**EcpA Is a Unique Major Pilin.** The overall structures of dimeric EcpA and EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup> are almost identical (average rmsd between EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup> molecules: 0.41 Å; rmsd between EcpA and EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup>: 0.6 Å), with deviations observed only in the loop regions, although there is one striking difference. In the absence of the chaperone, EcpA forms a dimer where the N-terminal extensions complement the incomplete Ig fold in the neighboring molecule. This displaces the A strand at the bulky tryptophan side chain (W11), which complements its equivalent position in the adjacent molecule (Fig. 1A and B and Fig. S1). In monomeric EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup>, this tryptophan (W10) is buried



**Fig. 1.** Crystal structures of EcpA. (A) An EcpA monomer with secondary structure colored green and loops colored gray.  $\beta$ -Sheets are labeled A–G and helices as 1–3. The N-terminal G strand is colored magenta and the flipped-out A strand is in blue. (B) Domain-swapped dimer of EcpA with one molecule colored as in A and the other red. The two domains are in a head-to-tail arrangement, with the flipped-out A strand of each lying along the groove below the A strand of the other subunit. (C) EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup> is colored green, the N-terminal G strand is colored orange, and the SDNK linker is in red. The invariant Trp11/10 (EcpA/EcpD) residue is buried beneath the loop between the A–A' strand and the usual disulfide bridge across the A and B' strands is not present. (D) Model of EcpA<sup>19–173</sup>dscA<sup>1–18</sup> in the same orientation as in C. EcpA and EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup> have been superimposed, and the electrostatic surface potential of residues 20–173 (EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup>) and a ball-and-stick representation of residues 2–17 (EcpA) are displayed. Positively charged surfaces are shown in blue; negatively charged surfaces are in red. The N-terminal extension runs the entire length of EcpA, and the hydrophobic pockets are labeled P1–P5. In the 16 N-terminal residues shown (D<sup>2</sup>VTAQAVATWSATAKK<sup>17</sup>), those bound in the P1–P5 pockets are purple, whereas the others are green.

within a deep pocket and is locked in place by the short linker between the A and A' strands (Fig. 1C). It is also interesting to note that EcpA contains no cysteine residues, as most other pilins of the CU family, such as the AafE-III adhesin (23) and the P pili major subunit PapA (24), contain a highly conserved disulfide bridge linking the N terminus of the A strand and C terminus of the B strand.

To confirm that EcpA molecules can also stably interact with one another via the EcpA NTE, we used multidimensional NMR to assign >90% of the amide backbone resonances of monomeric

EcpA<sup>19–173</sup>dscA<sup>1–18</sup> and carried out multiple relaxation experiments to probe the dynamics of EcpA (Fig. S3). The NMR structural and dynamic data confirm that the EcpA NTE is able to complement EcpA, forming a highly stable and ordered structure consistent with the crystal structure of EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup>.

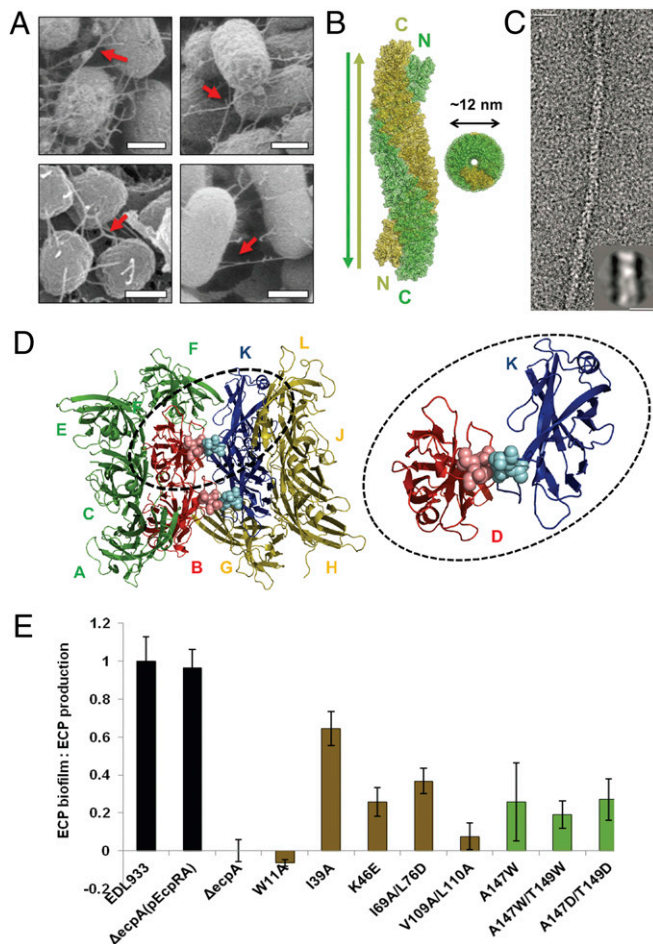
The “incomplete” Ig-like domain of CU pilins usually contains an exposed groove with five well-defined hydrophobic pockets (termed P1–P5) that are occupied by the incoming NTE of an adjacent subunit during pilus formation (22). In EcpA the Ig-like fold is highly extended, creating a hydrophobic groove of ~50 Å in length, and in addition to the well-defined pockets observed in other CU pilins there are two additional shallower binding sites for the N terminus of the incoming strand (Fig. 1D and Fig. S2).

**EcpA Contributes to Antiparallel Interactions.** Electron micrographs of *E. coli* microcolonies reveal that ECP forms a complex mesh of fibers with the crossing of pili and antiparallel/parallel interactions between adjacent filaments (Fig. 2A). The unusual asymmetric unit of the EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup> crystal lattice contains two antiparallel units along the extended crystallographic *c* axis, which forms striking intertwined antiparallel ECP fibers with a width of ~12 nm (Fig. 2B). Interestingly, the width of antiparallel ECP fibers observed in our crystal structure is consistent with the published dimensions for intertwined interbacterial ECP (10). Modeling the native EcpA NTE in place of dscD<sup>1–17</sup> does not affect lattice contacts within this superstructure (Figs. S2 and S4). However, it would cause clashes between symmetry-related superstructures within the crystal, and may explain the inability of EcpA<sup>19–173</sup>dscA<sup>1–18</sup> to crystallize.

High-resolution EM was used to visualize negatively stained, purified ECP fibers and shows that they share a common morphology: single, flexible fibers measuring ~6.5 nm wide by ~1 μm in length (Fig. 2C and Fig. S4). Furthermore, initial single-particle analysis along the fiber length has revealed dimensions that vary between 5.5 and 7.5 nm. This is indicative of a helical nature of the filaments, which is also supported by a number of class sums (Fig. S4). In the crystal structure of EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup>, although the antiparallel fibers are supercoiled about one another, giving rise to a total width of ~12 nm (Fig. 2B), the individual pilus dimensions are 5.4 × 7.6 nm (Fig. S4) and, moreover, EcpA monomers can be readily modeled with NTEs complementing adjacent molecules (Fig. S4). The overall effect is a “zigzagging” and twisting of EcpA along the fiber length, giving the appearance of a further entwining within these single ECP filaments.

Running along the central axis of the intertwined ECP superstructure, a significant interface is observed that is generated by the burial of a hydrophobic loop, between the E strand and helix 3, away from the solvent (Fig. 2D and Fig. S5). Here, the side chains of residues Ala147, Val148, and T149 from diagonally adjacent subunits interact across the interfiber axis. On the external face of the structure, backbone amide and carbonyl atoms from the C-terminal residue within the SDNK linker make β-sheet interactions with the same residue across the fiber (Fig. S5). Although this residue is not present in WT EcpA, the position is occupied by Ala1 and may still contribute to the stability of this superstructure in vivo. The buried surface area of the fiber interface is ~210 Å<sup>2</sup> for each EcpA molecule, and intertwining of over just a half-helical turn (~1,890 Å<sup>2</sup> buried surface) would result in substantial stability (Fig. 2B).

To assess our model of single ECP fibers, we constructed a series of EcpA mutants (I39A, K46E, I69A/L76D, and V109A/L110A) that are expected to disrupt correct pilus quaternary structure (Fig. S5 and Tables S2 and S3), and another mutant in the donor strand (W11A), which is predicted to be important for the polymerization of EcpA. In addition, to examine the role of ECP in biofilm formation, we constructed three further mutants (A147W, A147W/T149W, and A147D/T149D) to specifically disrupt antiparallel ECP–ECP interactions (Fig. 2D and Fig. S5 and Tables S2 and S3). Plasmids coding for wild-type (pEcpRA) and mutants of EcpA



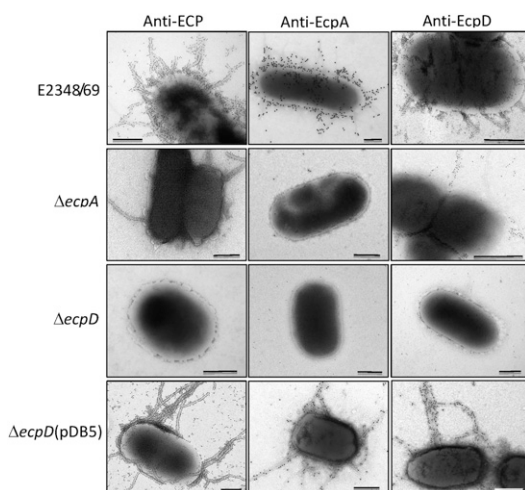
**Fig. 2.** Antiparallel fiber formation of EcpA. (A) SEMs showing a mesh of ECP fibers. (Scale bars, 500 nm.) The red arrows highlight ECPs crossing one another and forming parallel and antiparallel superstructures. (B) Structure of two intertwined antiparallel ECP fibers. One fiber running from the N to C terminus is colored green (top to bottom), whereas the other is in olive and runs from the C to N terminus (top to bottom). The diameter of the intertwined fiber is ~12 nm. (C) TEM analysis of negatively stained ECP fibers. The filaments are of an average width of ~6.5 nm ± 1 nm and different lengths. (Scale bar, 12 nm.) (Inset) A total average of 133 aligned single images of short stretches of filament band pass-filtered to 240 and 20 Å. (Scale bar, 10 nm.) (D) Interchain interactions along the internal face of the intertwined antiparallel ECP fibers. The asymmetric unit of the EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup> structure is shown as a cartoon (Left) with one fiber colored green and the other fiber colored olive. EcpA molecules that interact across the interface are colored red (chains B and D) and blue (chains I and K), and residues A147, V148, and T149 from the E-α3 loops are shown as spheres. The interaction site between chains D and K (Right) has been magnified for clarity. (E) Ratio of ECP-mediated biofilm to ECP production in EHEC EDL933ΔecpA. All mutants have been normalized to ΔecpA and wild-type EDL933. WT, black; intra-ECP mutants, brown; antiparallel inter-ECP mutants, green. Bars represent standard error on the mean.

were transformed into an *ecpA* knockout strain (EHEC EDL933ΔecpA), and ECP production in biofilms and quantification of biofilm were determined (Fig. 2E and Fig. S5).

In contrast to wild-type protein, no EcpA production was detected from expression of the W11A mutant (Fig. S5). As expected, the ability of this strain to form biofilms was equivalent to EDL933ΔecpA (Fig. 2E). Consistent with our structural studies, these data highlight the critical role that the NTE and W11 play in the secretion and assembly of ECP. The K46E, I69A/L76D, and V109A/L110A mutant strains showed a marked reduction in the ability to form biofilms compared with wild-type (Fig. 2E and

Fig. S5). These mutants are predicted to stabilize the native pilus structure, and its disruption would likely affect key aspects of ECP-dependent biofilm formation. Moreover, the A147W, A147W/T149W, and A147D/T149D strains were less able to form ECP-dependent biofilm compared with wild-type (Fig. 2E and Fig. S5). Although the abolition of antiparallel inter-ECP interactions does not completely abrogate ECP-dependent biofilm, the complex network formed in ECP biofilms (Fig. 2A) suggests that many types of interaction may play a role (e.g., parallel entwining of fibers). These data support the notion that this antiparallel interface contributes to EcpA–EcpA interactions during biofilm formation.

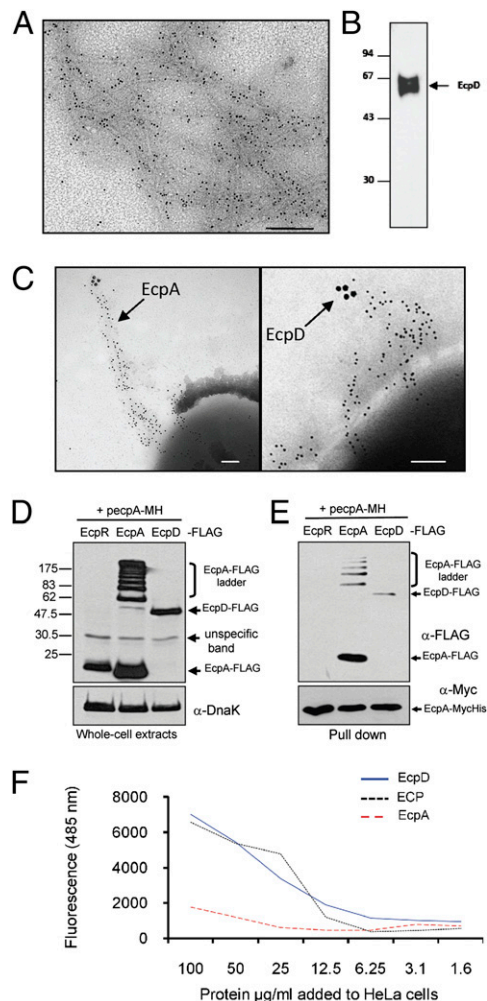
**EcpD Is Required for Assembly of EcpA into Fibers.** To elucidate the function of EcpD in ECP assembly, EPEC E2348/69  $\Delta ecpA$  and  $\Delta ecpD$  mutants were generated. A central role of EcpD in ECP biogenesis is supported by Western blotting analysis of whole-cell extracts of EPEC strains harvested from DMEM showing no detectable EcpA pilin monomer in both  $\Delta ecpA$  and  $\Delta ecpD$  mutants. In addition, EcpA was not detected in the growth medium. The most plausible explanation for these results is that in the absence of EcpD, the EcpA subunit is not secreted and is therefore subsequently degraded. Furthermore, the long ECP filaments, typically displayed by E2348/69, were not detected in either mutant, as revealed by immunoelectron microscopy (IEM) using anti-ECP antibodies (Fig. 3). These data indicated that EcpD is required for EcpA subunit stability and pilus assembly. Reintroduction of *ecpD* carried on pDB5 (Tables S2 and S3) into the  $\Delta ecpD$  mutant restored pilus production. This is consistent with previous observations showing that *matE* (equivalent to *ecpD* in EPEC) was required for surface expression of the Mat fimbriae in *E. coli* IHE3034 (13). Surprisingly, a derivative  $\Delta ecpA$  mutant displayed a few stunted fibers that were significantly shorter than typical ECP filaments. These previously unknown fibers were recognized by anti-ECP serum raised against purified ECP pili from *E. coli* O157:H7 (EDL933). The absence of these enigmatic fibers in the  $\Delta ecpD$  mutant provides a clue as to their nature. Efforts leading to isolation of these fibers yielded structures composed entirely of EcpD (~60 kDa), as determined by Western blotting using anti-EcpD antibodies. Furthermore, these fibers could be immunogold-stained with anti-EcpD antibodies (Fig. 4A and B). Similarly, IEM



**Fig. 3.** Analysis of ECP production on EPEC E2348/69 strains by immunoelectron microscopy. Bacteria were reacted with the indicated primary antibodies and secondary gold-labeled antibodies on Formvar-coated copper grids and then negatively stained with phosphotungstic acid. Note the presence of short fibers on the wild-type strain and the  $\Delta ecpA$  mutant that react with anti-ECP and anti-EcpD sera. (Scale bars, 500 nm.)

studies of EPEC strains using anti-EcpD antibodies showed gold-labeled fibers on both wild-type and  $\Delta ecpA$  mutant strains but not on the  $\Delta ecpD$  mutant (Fig. 3). These data confirm that EcpD fibers can be formed in the presence or absence of EcpA.

**EcpD Is a Tip Pilus Adhesin.** Not only do these data suggest that the EcpD pilin has the ability to polymerize autonomously but they also implicate EcpD in usher pore opening, a task usually performed by the tip adhesin (25, 26). To further test the localization of EcpD within the native ECP fiber, double IEM with anti-



**Fig. 4.** EcpD is a novel polymerized tip adhesin. (A) Pili were purified from a  $\Delta ecpA$  mutant and analyzed by immunoelectron microscopy. (Scale bar, 250 nm.) (B) Western blotting using anti-EcpD antibodies. An ~60-kDa protein, corresponding to the predicted size of EcpD, was obtained after dissociation of the fibers confirming the composition and nature of the fibers. (C) Colabeling of EPEC E2348/69 by immunoelectron microscopy with anti-EcpA (plus anti-rabbit IgG conjugated to 10-nm gold particles) and anti-EcpD (labeled with 20-nm gold particles) antibodies showed that EcpD is preferentially located at the tip of the ECP pilus, whose stalk is composed of the EcpA protein. (Scale bars, 100 nm.) (D and E) Protein–protein interactions between Ecp proteins. Detection of FLAG-tagged Ecp proteins in whole-cell extracts (D) of EPEC strains using anti-FLAG antibodies and a pull-down assay (E) showing the interaction between EcpA-Myc-His and EcpA-FLAG or EcpD-FLAG but not EcpR-FLAG detected by Western blotting using anti-FLAG antibodies. (F) Binding of purified EcpD-His and EcpA-His proteins and ECP to HeLa cells. After a 2-h incubation and removal of unbound proteins, binding was detected with specific primary antibodies and a secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488. It is apparent that EcpD binds with higher affinity than ECP or EcpA to epithelial cells.

EcpA and anti-EcpD antibodies conjugated with 10- and 20-nm colloidal gold particles, respectively, was performed on WT E2348/69. In multiple IEM experiments performed using the combination of antibodies, we found that anti-EcpA antibodies decorate long peritrichous filaments whereas EcpD is clearly seen located at the tip of these structures, indicating that EcpD performs the role of a tip adhesin (Fig. 4C).

Although our structural work on donor strand-complemented EcpA suggests that EcpA and EcpD interact with each other, we confirmed this by coexpression pull-down assays. EPEC E2348/69 strain derivatives expressing EcpR, EcpA, and EcpD FLAG-tagged proteins were constructed (Fig. 4D and E and Tables S2 and S3), and the resulting strains were transformed with plasmid pcepA-MH expressing the EcpA-Myc-His-tagged protein (Tables S2 and S3). Cell extracts of these strains were mixed with Ni-NTA agarose resin and subjected to SDS/PAGE to resolve the interacting proteins. As shown in Fig. 4E, EcpA-Myc-His was copurified with EcpA-FLAG, confirming EcpA-EcpA self-association, but also it was copurified with EcpD-FLAG, in agreement with its presence at the pilus tip and with the structural analysis described above. In support of strong EcpA-EcpA associations is a ladder of EcpA multimers seen under denaturing SDS/PAGE, regardless of the presence of the FLAG tag (Fig. 4D and E). EcpR-FLAG, used as control, did not copurify with EcpA-Myc-His.

Previously, we reported that purified ECP is able to bind cultured epithelial cells (10, 12). As these data imply a specific host-adhesive role for EcpD, we next quantitatively compared binding properties of recombinant EcpA, EcpD, and purified ECP to HeLa cells. Although there is some evidence of cell binding for EcpA at very high concentrations, the binding activity of EcpD is much stronger and comparable to that for full ECP (Fig. 4F).

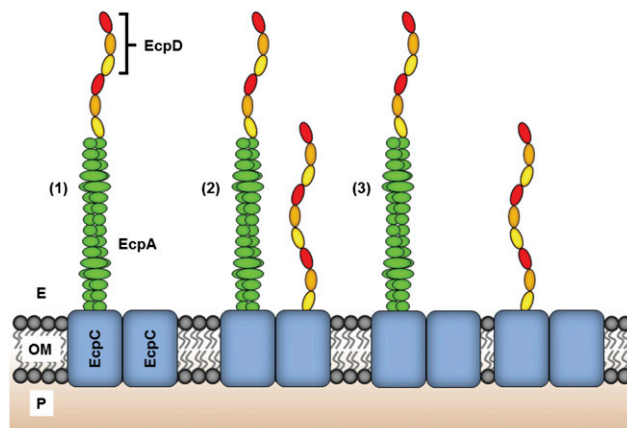
## Discussion

**ECP Is a Novel Variant of the CU Family.** The overall structure of EcpA is quite similar to the Ig-like fold of other CU pilins (23, 24), and the Dali server (27) identified the major colonization factor antigen I (CFA/I) pilin CfaB [Protein Data Bank (PDB) ID code 3f84 (28)] as having high tertiary homology (Z score: 12.3; rmsd: 3.1 Å; Fig. S6); however, EcpA is much larger, with dimensions  $\sim 25 \times 25 \times 60$  Å, and is composed of  $\sim 50\%$  hydrophobic residues. The G strand of EcpA contains 16 residues, and during fiber formation the N-terminal extension of an adjacent subunit must complement  $\sim 50$  Å of groove length within EcpA. In the current model for CU donor-strand exchange (DSE) (17), the chaperone molecule complements the four hydrophobic pockets (P1–P4) and, during exchange, the incoming NTE forms an encounter complex with a vacant fifth pocket (P5) and then “zips” through all the remaining pockets as the chaperone “unzips” out; this has been termed the “zip-in-zip-out” mechanism (19). In this model, the P5 pocket can be sampled by an incoming NTE while still in complex with its chaperone, and an invariant Gly residue (in the type I fimbria) ensures the correct register at the P4 site. There is no glycine at the N terminus of EcpA, although there is an invariant tryptophan residue (W11) that is locked underneath the A–A’ linker, the putative P3 site for ECP, deep within the core of the structure (Fig. 1C and D). It is likely that W11 ensures the correct register and stability of the incoming NTE, as no other residue would satisfy this position. However, the burial of such a large side chain during DSE would require an extensive conformational change or partial unfolding, so that the vacant groove of the subunit is wedged open by the chaperone, displacing the A strand and A–A’ linker that eventually covers W11. This notion is consistent with the conformation observed in our structure of the domain-swapped EcpA dimer (Fig. 1A), where the swapped A strand crosses over to the other molecule at the linker just where it meets W11.

In CU systems, the chaperone stabilizes a polymerization-competent form of the pilus subunit by inserting two strands between the A and F strands of the pilin to form an atypical Ig fold. In *Salmonella enterica* Saf pilus, *Yersinia* Caf1, and *E. coli* Pap systems, there are few structural differences in the pilin when bound to the chaperone or present in a polymerized form (17–19, 29). For ECP, it is difficult to envisage how such a large hydrophobic side chain in the NTE (W11), which is critical for biogenesis, could be inserted into the core without a significant “opening” of the pilin structure by the chaperone. Comparison of the structures of FimH in a polymerized fiber (30, 31) with usher-chaperone (FimH–FimC–FimD) and chaperone (FimH–FimC) complexes (32, 33) reveals that FimC displaces the loop between the A and A’ strands in FimH by  $\sim 10$  Å (Fig. S6). In the context of the ECP system, it seems likely that the chaperone for EcpA would use a similar mechanism to promote DSE.

**EcpD Is a Polymerized Tip Adhesin.** Previously, the only confirmed component of the pilus was the major subunit EcpA (8–13, 34). EcpD presents a completely novel tip adhesin as a result of the presence of an NTE and its subsequent ability to polymerize independently. Classical tip adhesins from the CU family lack the NTE. A BLAST (35) query of EcpA and EcpD identified a range of important Gram-negative bacteria, many of which are enterobacteria primarily residing in the gastrointestinal and urinary tracts. Although EcpD is generally well conserved, some species lack N-terminal residues (Fig. S2), suggesting that EcpD polymerization is not essential in these organisms. EcpD has likely been fine-tuned through evolution to recognize specific host receptors in the organism’s niche environment, and in *E. coli* it seems that the increased avidity from polymerization of EcpD is advantageous for its survival. Based on our work showing that polymerized EcpD is normally incorporated within the tip of ECP but can also form functional fimbria independent of EcpA, we propose three different architectural models for the generation of ECP fibers (Fig. 5).

In this paper, we have provided atomic insight into the biogenesis of ECP fibers and their role in bacteria–bacteria interactions, for example during biofilm formation or cell adherence. Furthermore, because a  $\Delta ecpA$  mutant in NMEC has been shown to abrogate biofilm development (13), although we have demonstrated that EcpD can still be exported as a polymer, the role of ECP in biofilms



**Fig. 5.** Models of ECP architecture in *E. coli*. Model 1: A single ECP fiber is exported through a single pore of an EcpC dimer. The pilus is composed of a polymerized EcpD tip and a major EcpA shaft. Model 2: An ECP fiber as in model 1 is cosecreted through alternate pores of an EcpC dimer along with a polymerized EcpD fiber. Model 3: As in model 2, although the two unique fibers are exported through separate EcpC dimers. E, extracellular space; OM, bacterial outer membrane; P, bacterial periplasm.



can be wholly attributed to the major pilin domain EcpA. It is interesting to note that ECP is highly conserved between enteric bacterial species; for example, *Serratia proteamaculans*, *S. odorifera*, *Klebsiella sp.*, *K. pneumoniae*, and *Enterobacter cancerogenus* possess fimbrial subunits with high homology to EcpA (80%, 82%, 98%, 97%, and 96% sequence identity, respectively), which may suggest a role for ECP in stabilizing multispecies biofilms by interactions through EcpA orthologs. The ECP system presents a novel variant of the CU family with a dual role in host cell recognition and biofilm formation. The multifaceted nature of ECP architecture makes it a potential template for the design of engineered nanofibers based on a CU system, and conclusions from our work provide an important first step in this process.

## Materials and Methods

**Protein Purification.** Residues 1–173 of EcpA and the donor strand-complemented constructs EcpA<sup>19–173</sup>dscA<sup>1–18</sup> and EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup>, with N-terminal His<sub>6</sub> tags, were expressed in *E. coli* and purified by Ni-NTA chromatography followed by gel filtration.

**Crystallization.** EcpA (12.5 mg/mL) and EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup> (7 mg/mL) in 20 mM Tris-HCl (pH 8), 200 mM NaCl were crystallized at 293K by sitting-drop vapor diffusion against 15% PEG 3350, 100 mM phosphate/citrate (pH 3.2), 200 mM NaI or 20% PEG 3350, 200 mM Na citrate (pH 8.4), respectively.

- Kline KA, Fälker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B (2009) Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 5:580–592.
- Proft T, Baker EN (2009) Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria—Structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci* 66:613–635.
- Ofek I, Hasty DL, Doyle RJ (2003) *Bacterial Adhesion to Animal Cells and Tissues* (Am Soc Microbiol, Washington, DC).
- Croxen MA, Finlay BB (2010) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8(1):26–38.
- Picard B, et al. (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* 67:546–553.
- Murray CJL, Lopez AD (1997) Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349:1498–1504.
- Esrey SA, Potash JB, Roberts L, Shiff C (1991) Effects of improved water supply and sanitation on ascariasis, diarrhoea, dracunculiasis, hookworm infection, schistosomiasis, and trachoma. *Bull World Health Organ* 69:609–621.
- Pouttu R, et al. (2001) *matB*, a common fimbriin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. *J Bacteriol* 183:4727–4736.
- Avelino F, et al. (2010) The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the *E. coli* common pilus when adhering to cultured epithelial cells. *Int J Med Microbiol* 300:440–448.
- Rendón MA, et al. (2007) Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10637–10642.
- Blackburn D, et al. (2009) Distribution of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic *E. coli*. *J Clin Microbiol* 47:1781–1784.
- Saldaña Z, et al. (2009) The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. *J Bacteriol* 191:3451–3461.
- Lehti TA, et al. (2010) Mat fimbriae promote biofilm formation by meningitis-associated *Escherichia coli*. *Microbiology* 156:2408–2417.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2(2):123–140.
- Nataro JP, Steiner T, Guerrant RL (1998) Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 4:251–261.
- Nataro JP, et al. (1987) Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J* 6:829–831.
- Remaut H, et al. (2006) Donor-strand exchange in chaperone-assisted pilus assembly proceeds through a concerted  $\beta$  strand displacement mechanism. *Mol Cell* 22:831–842.
- Sauer FG, Pinkner JS, Waksman G, Hultgren SJ (2002) Chaperone priming of pilus subunits facilitates a topological transition that drives fiber formation. *Cell* 111:543–551.
- Zavialov AV, et al. (2003) Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: Preserved folding energy drives fiber formation. *Cell* 113:587–596.
- Baikalov I, et al. (1998) NarL dimerization? Suggestive evidence from a new crystal form. *Biochemistry* 37:3665–3676.
- Kelley LA, Sternberg MJE (2009) Protein structure prediction on the Web: A case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 4:363–371.
- Waksman G, Hultgren SJ (2009) Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol* 7:765–774.
- Anderson KL, et al. (2004) An atomic resolution model for assembly, architecture, and function of the Dr adhesins. *Mol Cell* 15:647–657.
- Verger D, Bullitt E, Hultgren SJ, Waksman G (2007) Crystal structure of the P pilus rod subunit PapA. *PLoS Pathog* 3:e73.
- Dubnovitsky AP, et al. (2010) Conserved hydrophobic clusters on the surface of the Caf1A usher C-terminal domain are important for F1 antigen assembly. *J Mol Biol* 403:243–259.
- Ford B, et al. (2010) Structural homology between the C-terminal domain of the PapC usher and its plug. *J Bacteriol* 192:1824–1831.
- Holm L, Rosenström P (2010) Dali server: Conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* 38(Web Server issue):W545–W549.
- Li YF, et al. (2009) Structure of CFA/I fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:10793–10798.
- Sauer FG, et al. (1999) Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. *Science* 285:1058–1061.
- Le Trong I, et al. (2010) Donor strand exchange and conformational changes during *E. coli* fimbrial formation. *J Struct Biol* 172:380–388.
- Le Trong I, et al. (2010) Structural basis for mechanical force regulation of the adhesin FimH via finger trap-like  $\beta$  sheet twisting. *Cell* 141:645–655.
- Choudhury D, et al. (1999) X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 285:1061–1066.
- Hung C-S, et al. (2002) Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol Microbiol* 44:903–915.
- Saldaña Z, et al. (2009) Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environ Microbiol* 11:992–1006.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50:760–763.

**Data Collection and Structure Determination.** Data for both crystals were collected at 100K at station I04 of the Diamond Light Source, United Kingdom. Crystals were cryoprotected in 20% PEG 200, 100 mM phosphate/citrate (pH 3.2), 500 mM NaI (EcpA) or 20% PEG 3350, 20% PEG 400, 200 mM Na citrate (pH 8.4) (EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup>). Data were processed, scaled, and refined using CCP4 (36). The structure of EcpA was determined with I-SAD, and EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup> was determined with molecular replacement. Processing and refinement statistics of the final models can be found in Table S1. The coordinates and structure factors for EcpA and EcpA<sup>19–173</sup>dscD<sup>1–17</sup> have been deposited in the PDB under ID codes 3Q52 and 3Q53, respectively.

**Electron Microscopy.** Detailed methods and protocols for SEM and high-resolution negative-stain transmission electron microscopy (TEM) can be found in *SI Materials and Methods*.

**Mutant Strains, Plasmid Construction, Biofilm Assays, and Protein Interaction Assays.** Detailed methods and protocols for the generation of mutants, tagged strains, plasmids, NMR, biofilm assays, protein interaction assays, and visualization assays can be found in *SI Materials and Methods*.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank the beamline scientists at I04 of the Diamond Light Source, United Kingdom, and Dana Blackburn for assistance. We thank the Wellcome Trust (Programme Grant 079819; Equipment Grant 085464 awarded to S.M.) and the National Institutes of Health (National Institute of Allergy and Infectious Diseases Grant AI66012 awarded to J. A. Giron) for financial support. J.L.P. was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant 42918Q.

# A Distinct Regulatory Sequence Is Essential for the Expression of a Subset of *nle* Genes in Attaching and Effacing *Escherichia coli*

Víctor A. García-Angulo,\* Verónica I. Martínez-Santos, Tomás Villaseñor, Francisco J. Santana, Alejandro Huerta-Saquero, Luary C. Martínez, Rafael Jiménez, Cristina Lara-Ochoa, Juan Téllez-Sosa,\* Víctor H. Bustamante, and José L. Puente

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

**Enteropathogenic *Escherichia coli* uses a type III secretion system (T3SS), encoded in the locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island, to translocate a wide repertoire of effector proteins into the host cell in order to subvert cell signaling cascades and promote bacterial colonization and survival. Genes encoding type III-secreted effectors are located in the LEE and scattered throughout the chromosome. While LEE gene regulation is better understood, the conditions and factors involved in the expression of effectors encoded outside the LEE are just starting to be elucidated. Here, we identified a highly conserved sequence containing a 13-bp inverted repeat (IR), located upstream of a subset of genes coding for different non-LEE-encoded effectors in A/E pathogens. Site-directed mutagenesis and deletion analysis of the *nleH1* and *nleB2* regulatory regions revealed that this IR is essential for the transcriptional activation of both genes. Growth conditions that favor the expression of LEE genes also facilitate the activation of *nleH1* and *nleB2*; however, their expression is independent of the LEE-encoded positive regulators Ler and GrlA but is repressed by GrlR and the global regulator H-NS. In contrast, GrlA and Ler are required for *nleA* expression, while H-NS silences it. Consistent with their role in the regulation of *nleA*, purified Ler and H-NS bound to the regulatory region of *nleA* upstream of its promoter. This work shows that at least two modes of regulation control the expression of effector genes in attaching and effacing (A/E) pathogens, suggesting that a subset of effector functions may be coordinately expressed in a particular niche or time during infection.**

**E**nteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is the leading cause of severe watery diarrhea in children in developing countries. This Gram-negative bacterium belongs to the attaching and effacing (A/E) family of pathogens, which includes enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. A/E pathogens colonize the intestinal tract of their host and use a type III secretion system (T3SS) to translocate an assortment of proteins called effectors into the cytosol of the enterocyte which subvert cell signaling pathways in order to promote bacterial colonization and proliferation. The characteristic A/E lesion caused by these pathogens consists of epithelial microvillus depletion and the formation of actin-rich pedestals beneath adhering bacteria (reviewed in references 17, 33, 45, 67, and 93).

The genes required for assembly of the T3SS in A/E pathogens are encoded by the locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island. Besides the structural T3SS genes, the LEE also encodes regulatory proteins, effectors, chaperones, and proteins involved in the hierarchical regulation of secretion (18, 29). Substrate effectors of the T3SS are encoded in the LEE, as well as in prophages and integrative elements scattered throughout the chromosome. LEE-encoded effectors include Tir, EspF, Map, EspH, EspG, and EspZ. These effectors are highly conserved in A/E pathogens and have been shown to promote bacterial adhesion and actin and tubulin rearrangements and to alter epithelial barrier function and mitochondrial membrane potential, among other cellular events (reviewed in references 8, 15, and 29). However, the repertoire of non-LEE-encoded effectors (Nle) is variable in A/E pathogens. Genome sequence analysis has shown that EPEC strain E2348/69, EHEC strain Sakai, and *C. rodentium* have a repertoire of 21, 50, and 29 genes (excluding pseudogenes), respectively, encoding confirmed and putative type III-secreted effectors (T3SE) (38, 74, 89). Secretion and translocation of most of these effectors have been confirmed using biochemical and pro-

teomic approaches (17, 19, 89). Among non-LEE-encoded effectors, NleA (also known as EspI) and NleB have been shown to be essential for the virulence of A/E pathogens (31, 46, 54, 96), while others contribute to colonization and full virulence, performing different and sometimes redundant functions within the host cell, including antiapoptotic activities, disruption of host innate immune responses by preventing NF- $\kappa$ B activation at different levels, increase of paracellular permeability, blockage of cell division, disruption of microtubule cytoskeleton, and inhibition of macrophage opsonophagocytosis, among others (4, 7, 13, 17, 21, 26, 34, 35, 38, 56, 57, 59, 60, 66, 69, 72, 75, 79, 84–86, 88, 94, 95, 97, 98, 100).

The expression of LEE genes is tightly regulated in A/E pathogens. Ler, encoded by the first gene of the *LEE1* operon, acts as the master transcriptional regulator of the rest of the LEE operons by counteracting the repression exerted by the global regulator H-NS (2, 5, 23, 25, 32, 63, 64, 81, 87). The LEE encodes two additional regulators, GrlA, an activator of *ler* transcription, and GrlR, which negatively regulates the expression of LEE genes (18). Together, GrlA and GrlR appear to regulate the spatiotemporal expression

Received 6 February 2012 Accepted 1 August 2012

Published ahead of print 17 August 2012

Address correspondence to José L. Puente, puente@ibt.unam.mx.

\* Present address: Víctor A. García-Angulo, Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA; Juan Téllez-Sosa, Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México.

Supplemental material for this article may be found at <http://jba.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.00190-12



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Análisis de la regulación transcripcional del  
operón *ecp* en *Citrobacter rodentium***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**ANDRÉS ESCALERA MAURER**



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

**TUTOR:  
M. EN C. VERÓNICA IRANZÚ MARTÍNEZ SANTOS**

**2012**