

03088 1

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

REGULACION TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *bfpA*
DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGENA (EPEC).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

VICTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLAN

264580





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.

PAGINACION

DISCONTINUA

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. José Luis Puente García, del Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor., México.

Este trabajo fue asesorado por el siguiente Comité Tutorial:

Dr. José Luis Puente García - Tutor principal

Dr. Fernando Valle Baheza

Dr. Juan Enrique Morett Sánchez

Durante el desarrollo del trabajo el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (no. 90275), del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudio de Posgrado de la UNAM (nos. 030402, 030308 y 030503) y del proyecto del Howard Hughes Medical Institute (no. 75191-527102).



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PROYECTO ACADEMICO DE
ESPECIALIZACION, MAESTRIA Y DOCTORADO
EN BIOTECNOLOGIA
IBT

OF. IBT/047/98

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR
P R E S E N T E

Por este conducto me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico del Programa de Ciencias Bioquímicas que se llevó a cabo el 23 de junio de 1998 se acordó poner a su consideración el siguiente Jurado para el examen de Doctorado en Biotecnología del M EN B. VICTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLAN, con número de cuenta 9181786-0 y número de expediente 30912038 con la tesis titulada "Regulación transcripcional del gen bfpA de Escherichia coli enteropatógena" dirigida por el Dr. José Luis Puente García.

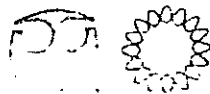
PRESIDENTE:	Dra. Gloria Soberón Chávez
SECRETARIO:	Dr. José Luis Puente García
VOCAL:	Dra. Alejandra Covarrubias Robles
VOCAL:	Dr. Mario Rocha Sosa
VOCAL:	Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos
SUPLENTE:	Dra. Guadalupe Espín Ocampo
SUPLENTE:	Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Sin otro particular aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor., 3 de agosto de 1998
COORDINADOR DEL PROGRAMA

DRA. AMELIA FARRES GONZALEZ-SARABIA



DEDICATORIAS

A Irma,
por su amor
y por todo lo que nos une.

A mi madre,
por todo su apoyo
y cariño.

A mis hermanos,
por su alegría y por todo
lo que hemos compartido.

A toda mi familia.

A mis compañeros y amigos,
especialmente a los que he
encontrado en este laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

A José Luis Puente por su excelente orientación para la realización de este trabajo, por la confianza que desde un inicio tuvo en mí, y sobre todo por su amistad.

A los jefes de este laboratorio: Edmundo Calva y José Luis Puente, por ser más que eso, por formar un equipo ideal de trabajo y convivir con nosotros.

A Francisco Javier Santana por su colaboración en la realización de algunos experimentos.

A mis compañeros de laboratorio, por sus valiosas críticas y por ese ambiente de cordialidad y amistad que siempre ha existido entre todos.

A los integrantes de mi comité tutorial y de mi jurado, por su asesoría, revisión y crítica de este trabajo.

INDICE

I.-	RESUMEN / ABSTRACT	1
II.-	INTRODUCCION	3
	-Patogénesis de EPEC	3
	-Regulación de <i>bfpA</i>	8
	-Importancia del estudio de la regulación de la expresión de los genes <i>bfp</i>	9
III.-	OBJETIVOS	11
IV.-	MATERIALES Y METODOS	12
V.-	RESULTADOS	22
	-BfpT activa la transcripción de <i>bfpA</i>	22
	-Purificación de BfpT	27
	-Análisis genético de la región reguladora de <i>bfpA</i>	28
	-Determinación de secuencias que inducen doblamientos en el DNA en la región reguladora de <i>bfpA</i>	44
VI.-	DISCUSION	46

VII.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	54
VIII.- BIBLIOGRAFIA	55
IX.- ANEXOS	65

-Apéndice I:

"Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation in enteropathogenic *Escherichia coli*".

Toru Tobe, G. K. Schoolnik, I. Sohel, Víctor H. Bustamante, and J. L. Puente.
Molecular Microbiology (1996) 21(5):963-975.

-Apéndice II:

Estudio de la expresión del activador transcripcional BfpT de *Escherichia coli* enteropatógena.

Martha G. Sosa Macías. (Director de tesis: M. en B. Víctor H. Bustamante Santillán).

Tesis de Licenciatura (1997).

-Apéndice III:

"Analysis of cis-acting elements required for *bfpA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*".

Víctor H. Bustamante, E. Calva, and J. L. Puente.
Journal of Bacteriology (1998) 180(11):3013-3016.

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es de los principales agentes etiológicos de diarrea en niños. Esta bacteria coloniza el intestino delgado, formando microcolonias sobre la superficie de las células epiteliales. El gen *bfpA* codifica para la subunidad estructural del pili BFP ("Bundle-Forming-Pilus"), el cual es necesario para el fenotipo de adherencia localizada. La expresión de *bfpA* varía en respuesta al medio de crecimiento, la temperatura y la concentración de amonio y requiere del locus *bfpTVW* (también llamado *perABC*), localizado 18 kb corriente abajo de *bfpA*, en el plásmido EAF ("EPEC Adherence Factor"). En este trabajo, nosotros mostramos que BfpT, un miembro de la familia de reguladores transcripcionales AraC, es el único producto del locus *bfpTVW* que se requiere para la activación de *bfpA*. Asimismo, nuestros resultados sugieren que *bfpV* participa como modulador negativo de la expresión de *bfpA* dependiente de BfpT. La interacción de BfpT con la región reguladora de *bfpA* ha sido difícil de estudiar *in vitro* debido a que no se ha logrado sobre-expresar y purificar esta proteína. Aun bajo el control de un promotor fuerte, el transcrito de *bfpT* parece traducirse a muy bajo nivel, lo cual puede estar asociado a la presencia de un alto contenido de codones raros. Como una alternativa para identificar la secuencia que reconoce BfpT, así como otros elementos *cis* necesarios para la expresión de *bfpA*, nosotros analizamos genéticamente su región reguladora. Mutagénesis sitio-dirigida y al azar, así como el análisis de construcciones conteniendo diferentes segmentos de la región reguladora de *bfpA* fusionados al gen reportero *cat*, nos permitieron la definición precisa de las regiones promotoras -10 y -35. Asimismo, pudimos demostrar que los elementos *cis* requeridos para la expresión de *bfpA*, dependiente de BfpT, están localizados entre las posiciones -85 y -46. Interesantemente, esta región presenta 73% de identidad con un trecho rico en AT de 40 pb, localizado en la región reguladora de *bfpT*, el cual se requiere para su auto-activación. La actividad de fusiones transcripcionales *bfpA-cat* que contienen una mutación en el promotor, que produce un nivel significativo de expresión independiente de BfpT, en combinación con un recorte hasta la posición-40, no fue reprimida por amonio pero sí por el medio de cultivo LB (Luria-Bertani). Estos resultados sugieren que la represión de *bfpA*, en respuesta al crecimiento en LB y a la concentración de amonio, está mediada por dos mecanismos diferentes.

ABSTRACT

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a common cause of diarrhea in small children. EPEC colonizes the small-bowel, forming microcolonies on the surface of epithelial cells. The *bfpA* gene codes for the structural subunit of the Bundle-Forming-Pilus (BFP), which is necessary for the localized adherence phenotype and is located on the EAF (EPEC Adherence Factor) plasmid. *bfpA* expression is regulated by growth medium, temperature, and ammonium concentration and requires the *bfpTVW* locus (also called *per*), located 18 kb downstream of *bfpA*. In this work, we showed that BfpT, a member of the AraC family of transcriptional activators, is the only product of the *bfpTVW* locus required for *bfpA* expression. Several attempts to overproduce and purify BfpT to analyze protein-DNA interactions at the regulatory region of *bfpA*, have been unsuccessful. Even under the control of a strong promoter, the *bfpT* transcript seems to be poorly translated, which might be associated with the high content of rare codons that span the structural gene. As an alternative route to identify the BfpT-binding sequence, as well as other *cis*-acting elements required for *bfpA* expression, we genetically analyzed its regulatory region. Site-directed and PCR-random mutagenesis, as well as deletion analysis of the *bfpA* upstream regulatory region, supported the assignment of the -10 and -35 promoter regions and demonstrated that the *cis*-acting elements that mediate BfpT-dependent regulation of *bfpA* are located between positions -85 and -46. Interestingly, this region shares a 73% identity with a 40-bp-long AT-rich tract located upstream of the *bfpT* gene, which is essential for *bfpT* autoregulation. The activity of *bfpA-cat* fusions carrying an up mutation promoter, that rendered a significant level of BfpT-independent expression, in combination with a deletion to position -40, was not repressed by ammonium but was still repressed in LB. These observations suggest that two different mechanisms are involved in *bfpA* repression, in response to the growth media and the ammonium concentration.

INTRODUCCION

Patogénesis de EPEC.

Las cepas de *Escherichia coli* asociadas a infecciones gastrointestinales, se pueden agrupar en cinco principales categorías: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC). Esta clasificación se basa principalmente en la presencia de ciertos factores de virulencia, características epidemiológicas y el serotipo O:H que presentan las cepas (Tabla 1) (Levine y Edelman, 1984; Levine, 1987; Nataro y Kaper, 1998).

En países en vías de desarrollo, cepas que pertenecen a serotipos clásicos de EPEC se aíslan frecuentemente en casos de diarrea en niños (Gomes et al., 1989; Cravioto et al., 1991; Echeverría et al., 1991). Los mecanismos moleculares por los cuales EPEC establece la infección han comenzado a elucidarse. El modelo actual propone tres fases: la adherencia localizada, la transducción de señales y la adherencia íntima (Fig. 1) (Donnenberg et al., 1997; Kaper, 1998; Nataro y Kaper, 1998). La primera fase consiste en la adherencia inicial, no-íntima, mediada por la formación de microcolonias bien definidas de bacterias sobre la superficie de las células epiteliales. Este tipo de adherencia, característica de las cepas de EPEC, se ha denominado adherencia localizada (AL) (Cravioto et al., 1979; Scaletsky et al., 1984). El fenotipo de AL requiere de la presencia de un plásmido de alto peso molecular, de aproximadamente 80 kb, conocido como plásmido EAF ("EPEC Adherence Factor") (Knutton et al., 1987; Nataro et al., 1987; Vuopio-Varkila y Schoolnik, 1991). Bacterias carentes de este plásmido no producen AL y son menos virulentas (Levine et al., 1985; McConnell et al., 1989). Estudios de microscopía han mostrado que la generación de AL por cepas de EPEC está asociada a la expresión de filamentos muy peculiares, delgados y largos, en la superficie bacteriana. Estos filamentos, además de agruparse formando ramilletes, se entrelazan formando una estructura semejante a una red que mantiene unidas a las bacterias, permitiendo así la formación de las microcolonias sobre las células epiteliales. Por sus características,

Tabla 1. Clases principales de *Escherichia coli* diarreogénica*.

Clases de <i>E. coli</i>	Epidemiología	Serogrupos comunes	Fimbrias	Interacción con enterocitos	Toxinas
enterotoxigénica (ETEC)	Diarrea infantil en países en desarrollo, diarrea del "viajero"	O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O115,	Clase 3 (K88, CFA/IV), Clase 4 (CFA/III), Clase 5 (CFA/I, CFA/II)	Adherencia por medio de fimbrias sin cambios morfológicos.	Enterotoxinas LTs y STs
enteropatógena (EPEC)	Diarrea infantil crónica y aguda en países en desarrollo, casos esporádicos en países desarrollados	O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142	Clase 4 (BFP)	Adherencia localizada, destrucción de microvellosidades, adherencia íntima, lesión A/E.	
enteroinvasiva (EIEC)	Disentería, diarrea usualmente en adultos	O28, O112, O124, O136, O143, O144, O147, O152		Invasión y multiplicación interna, eventualmente muerte celular.	SLT?, Enterotoxina EIET
enterohemorrágica (EHEC)	Diarrea copiosa sanguinolenta, brotes en adultos de países desarrollados	O157, O26, O111		Adherencia individual, lesión A/E, no invasiva.	Citotoxinas SLTs, Hemolisina EAST1?
enteroagregativa (EAEC)	Diarrea persistente en infantes de países en desarrollo	O51, O77, O86, O92, O126.	Clase 6 (AAF/I) AAF/II	Patrón de adherencia agregativa, destrucción de las microvellosidades?	Enterotoxina EAST1, Hemolisina

* Tomada y actualizada de Levine y Edelman (1984).

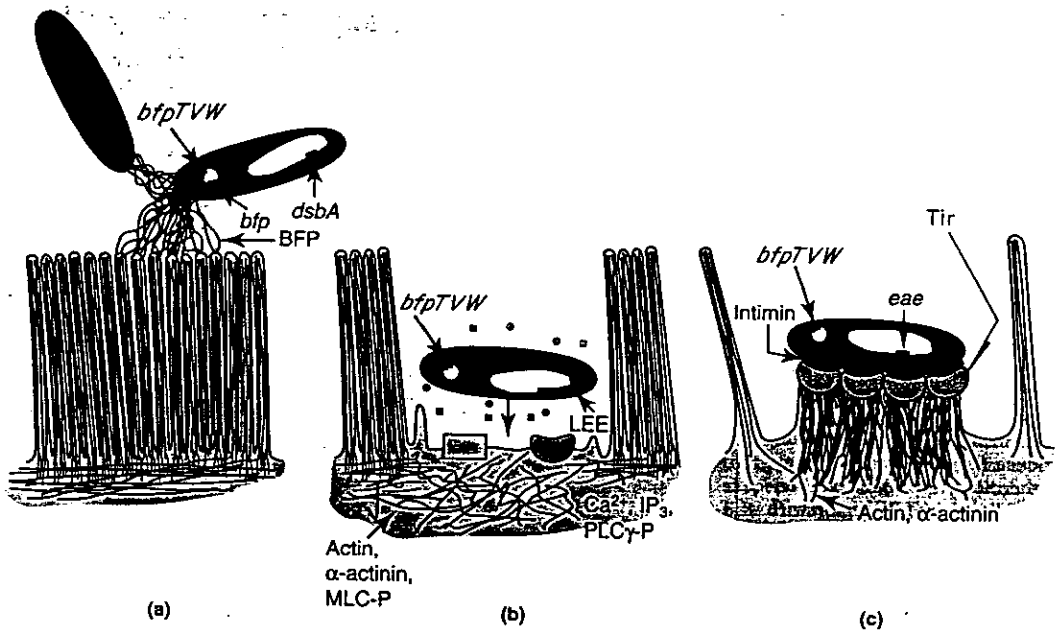
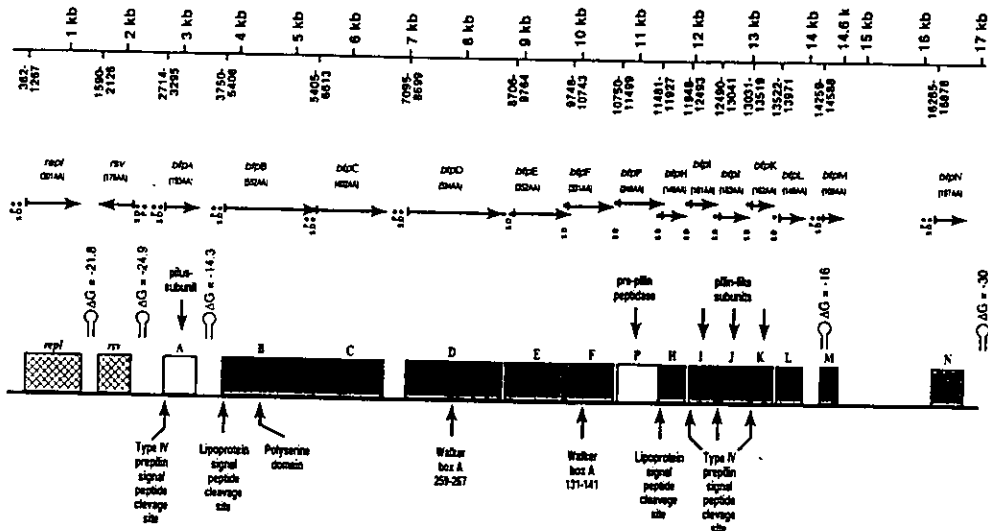


Fig. 1. Modelo de tres fases de la interacción de EPEC con células epiteliales. **(a)** La adherencia localizada involucra a la fimbria BFP, cuya síntesis requiere del operón *bfp*, presente en el plásmido EAF. BFP favorece la formación de agregados bacterianos y la adherencia a células epiteliales durante la primera fase de la infección. **(b)** Durante la segunda fase de la infección, EPEC activa rutas de transducción de señales en la célula huésped, mediante la secreción, dependiente de un sistema especializado tipo III, de un conjunto de proteínas denominadas Esp, las cuales causan la acumulación de actina, α -actinina, talina y ezrina debajo del sitio donde se une la bacteria. También induce el flujo de otras moléculas del huésped, como inositol fosfato, calcio y fosfolipasa C. En forma sobresaliente, promueve la translocación de la proteína Tir ("Translocated intimin receptor") hacia la célula huésped. **(c)** Después de esta compleja cascada de eventos de señalización, Tir es fosforilada e incorporada a la membrana de la célula huésped. Posteriormente la bacteria se adhiere estrechamente a su recién creado receptor, la proteína Tir, a través de una proteína de membrana externa denominada intimina. El resultado final de esta interacción es la formación de una estructura en forma de pedestal sobre la que la bacteria se establece y la destrucción de las microvellosidades alrededor de este sitio. En su conjunto este proceso es conocido como lesión de adherencia y destrucción o fenotipo A/E ("Attaching and Effacing lesion") (Donnenberg et al., 1997; Kaper, 1998; Nataro y Kaper, 1998).

a estas estructuras se les ha denominado pilis formadores de mechones (BFP, "Bundle-Forming Pilus") (Girón et al., 1991; 1993). La subunidad formadora de los pilis BFP es una proteína de 18.5 kDa, llamada BfpA, la cual presenta las características típicas de las proteínas que forman la familia de pili tipo IV (Donnenberg et al., 1992; Sohel et al., 1993). Este tipo de pili son considerados factores importantes de virulencia en varias bacterias patógenas (Hobbs y Mattick, 1993; Strom y Lory, 1993). Una región del plásmido EAF de 11.5 kb, la cual contiene un conjunto de 14 genes denominados *bfp*, es suficiente para producir el pili BFP (Fig. 2) (Sohel et al., 1996; Stone et al., 1996).

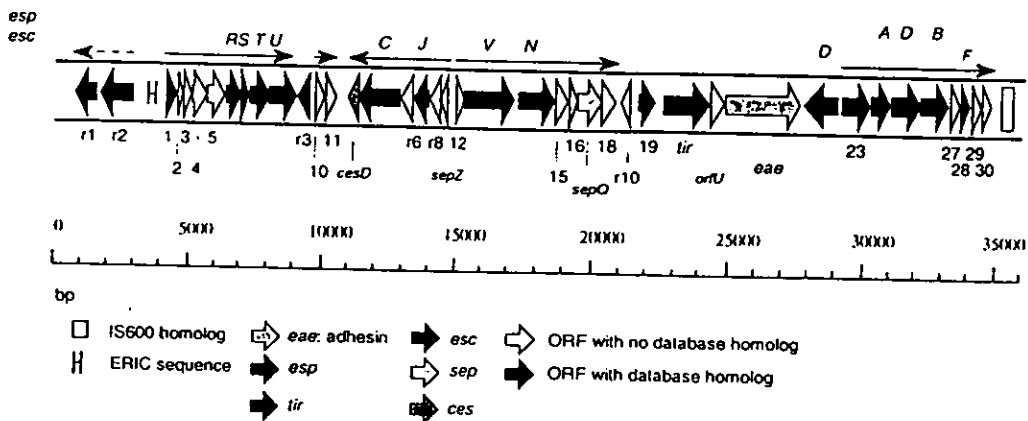
En la segunda fase, la bacteria secreta un conjunto de proteínas a través de un sistema de secreción tipo III. Estas proteínas han sido implicadas en la activación de rutas de transducción de señales en la célula huésped, lo cual provoca un aumento en las concentraciones intracelulares de calcio e inositol fosfato, la fosforilación de varias proteínas, rearrreglos del citoesqueleto y destrucción de las microvellosidades (Manjarrez-Hernández et al., 1992; Rosenshine et al., 1992; Foubister et al., 1994(a); Kenny y Finlay, 1997). Esta activación de las rutas de transducción de señales requiere de al menos tres proteínas que son secretadas por EPEC (EspA, EspB y EspD) y de un conjunto de genes (*sep* y *esc*) que codifican para un sistema de secreción tipo III (Foubister et al., 1994(b); Jarvis et al., 1995; Kenny y Finlay, 1995; Kenny et al., 1996; Lai et al., 1997; Elliot et al., 1998; Nataro y Kaper, 1998). Finalmente, durante la tercera fase se produce la adherencia íntima de EPEC con las células epiteliales, donde hay proliferación de filamentos de actina y otras proteínas del citoesqueleto debajo de esta adhesión, formándose una estructura conocida como de copa o pedestal (Jerse et al., 1990; Rosenshine et al., 1996). Las proteínas intimina (codificada por el gen *eaeA*) y Tir ("Translocated Intimin Receptor", codificada por el gen *tir*) son requeridas en esta etapa. La intimina es una proteína de membrana externa que se une a Tir, la cual es una proteína que EPEC transfiere a la célula huésped, donde se fosforila y se inserta en la membrana, dando lugar a la formación del pedestal donde EPEC se adhiere íntimamente (Jerse y Kaper, 1991; Kenny et al., 1997(b)). En su conjunto, el proceso por el cual se establece el contacto

(A)



(B)

The locus of enterocyte effacement (LEE) of E2348/69



(C)

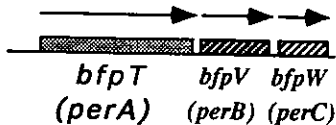


Fig. 2. Genes de EPEC que causan los fenotipos de adherencia localizada y A/E. **(a)** Región del plásmido EAF que contiene el operón *bfp*, que codifica para las proteínas requeridas en la biogénesis del pili BFP, el cual es necesario para el fenotipo de adherencia localizada. *bfpA* es el primer gen del operón y codifica para la subunidad estructural del pili BFP (Sohel et al., 1996). **(b)** Región del cromosoma denominada LEE ("Locus for Enterocyte Effacement"), la cual es necesaria para la generación de la lesión A/E. Esta región contiene 41 fases abiertas de lectura que incluyen los genes: *eaeA* (intimina), *tir* ("Translocated intimin receptor"), *espA*, *espB* y *espD* ("E. coli-secreted protein"). Además de estos genes se encuentran 10 genes denominados *esc* ("E. coli-secretion), los cuales comparten homología con los componentes del sistema de secreción tipo III de otras bacterias Gram-negativas (Elliot et al., 1998). **(c)** Organización del operón *bfpTVW* o *perABC*, el cual está localizado en el plásmido EAF, 6.7 kb corriente abajo del operón *bfp*. El producto del gen *bfpT* (*perA*) se requiere para la expresión de *bfpA*; mientras que, el producto de *bfpW* (*perC*) ha sido involucrado en la expresión del gen *eaeA* (Gómez-Duarte, 1995; Tobe et al., 1996).

íntimo de EPEC con las células epiteliales, se conoce como lesión A/E ("Attaching and Effacing phenotype") y los genes responsables de su producción (genes *esp*, *sep*, *esc*, *eaecA* y *tir*) están codificados en una región del cromosoma de EPEC denominada LEE ("Locus of Enterocyte Effacement ") (Fig. 2) (McDaniel et al., 1995; McDaniel y Kaper, 1997; Elliott et al., 1998).

Regulación de *bfpA*.

El fenotipo de AL producido por EPEC ha sido observado tanto *in vivo*, en biopsias de intestino delgado de niños infectados, como *in vitro*, en ensayos de adherencia en cultivos de monocapas celulares (Cravioto et al., 1979; Rothbaum et al., 1982; 1983; Scaletsky et al., 1984; Nataro et al., 1987). *In vitro*, el fenotipo de AL y la producción de BFP, en la superficie bacteriana, se inducen después de transferir a la bacteria de un medio rico (LB) al medio de cultivo de células DME ("Dulbecco's Modified Eagle's medium") (Vuopio-Varkila et al., 1991).

Estudios realizados por nuestro grupo han revelado que *bfpA*, el gen que codifica para la subunidad estructural del pili BFP, se expresa durante la fase exponencial de crecimiento en medio DME a 37°C (Puente et al., 1996). Temperaturas altas (41°C) o bajas (29°C), la presencia de amonio en el medio y el crecimiento en medio LB, reprimen su expresión (Puente et al., 1996). Dado que *bfpA* es el primero de los 14 genes *bfp*, los cuales se ha propuesto conforman un operón (Ramer et al., 1996), es posible pensar que la región reguladora de *bfpA* controlaría la expresión del pili BFP en respuesta a señales ambientales, como las descritas arriba. A este respecto, se ha propuesto que la regulación de la expresión de las fimbrias en respuesta a señales ambientales y nutricionales, permite a diferentes bacterias entéricas colonizar nichos particulares a lo largo del tracto intestinal (Edwards y Puente, 1998). Por ejemplo, condiciones de alta concentración de glucosa y baja concentración de amonio, las cuales favorecen la expresión de BFP, permiten la colonización de la parte proximal del intestino delgado por EPEC; mientras que, condiciones de baja concentración de glucosa y alta concentración de amonio, las cuales favorecen la expresión de la fimbria 987P, permiten la colonización de la parte

distal del intestino delgado por ETEC (Puente et al., 1996; Edwards y Schifferli, 1997).

La expresión de *bfpA* requiere del producto de *bfpT*, el primer gen del locus *bfpTVW*, localizado 6.7 kb corriente abajo del operón *bfp* (Fig. 2) (Tobe et al., 1996; este estudio). El locus *bfpTVW*, previamente identificado como el locus *perABC*, se ha involucrado también en la expresión del gen *eaeA* y la mayoría de los genes *esp* (Gómez-Duarte y Kaper, 1995; Kenny y Finlay, 1995; Kenny et al., 1997(a)). *bfpT* (*perA*) codifica para una proteína (BfpT) de 274 aminoácidos, la cual pertenece a la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS (Tobe et al., 1996).

Varias proteínas que pertenecen a la familia AraC/XylS se han involucrado como reguladores positivos de la expresión de fimbrias u otros factores de virulencia en diferentes bacterias patógenas, constituyendo una subfamilia (Gallegos et al., 1997). CfaD, Rns, CsvR y FapR son proteínas que regulan en ETEC la expresión de las fimbrias CFA/I, CSI, CS5 y 987P, respectivamente (Caron et al., 1989; Klaasen y deGraaf, 1990; Savelkoul et al., 1990; de Haan et al., 1991). AggR regula la expresión de la fimbria AAF/I de EAEC (Nataro et al., 1994). ToxT regula la expresión del pili tipo IV (TCP) de *Vibrio cholerae* (Higgins et al., 1992; Ogierman y Manning, 1992). ExsA, InvF, VirF y LcrF, son proteínas que regulan la expresión de varios factores de virulencia en *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* y *Yersinia* sp, respectivamente (Sakai et al., 1986; Cornelis et al., 1989; Kato et al., 1989; Frank y Iglewski, 1991; Allaoui et al., 1993; Kaniga et al., 1994). Sin embargo, se conoce poco sobre el mecanismo molecular por el cual estos activadores de la familia AraC regulan la expresión de genes de virulencia. Además, para la mayoría de ellos no se ha definido con precisión la secuencia de DNA que reconocen, en las regiones reguladoras de los genes que activan.

Importancia del estudio de la regulación de la expresión de los genes *bfp*.

La colonización de tejidos es un paso esencial durante el proceso de patogénesis de EPEC. En la primera fase de este proceso, se requiere de la expresión del pili BFP, el cual va a mediar la interacción inicial de la bacteria con las

células del epitelio. Los genes *bfp* codifican para proteínas involucradas en la biogénesis del pili BFP. El estudio de los factores físicos y/o químicos que inducen la expresión del pili, y del mecanismo molecular que controla la expresión de los genes *bfp*, ayudará a entender mejor las condiciones que determinan su síntesis durante la infección. Por otra parte, la posible relación que existe entre el locus *bfpTVW* y el control de la expresión de genes contenidos en el locus LEE, sugiere que este locus podría coordinar la expresión de factores de virulencia en EPEC. De esta manera, este estudio constituye el esfuerzo inicial dirigido a integrar un mejor conocimiento de la regulación genética de factores de virulencia en el contexto de la interacción huésped-parásito, lo que permitirá integrar un modelo de la biología de BFP y otros factores de virulencia en EPEC.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar él o los mecanismos moleculares que regulan la expresión de los genes *bfp* de EPEC.

Objetivo particular

Identificar y caracterizar secuencias de DNA involucradas en la regulación de la expresión del gen *bfpA*, dependiente del activador transcripcional BfpT.

Objetivos específicos

- a. Analizar el papel de BfpT en la activación de *bfpA*.
- b. Determinar la secuencia de DNA con la que interactúa el activador BfpT.

MATERIALES Y METODOS

Cepas de *E. coli*.

- B171-8 EPEC 0111:NM, contiene el plásmido EAF (Puente et al., 1996).
- B171-10 Cepa curada espontáneamente del plásmido EAF y del plásmido críptico de 3.0 kb, derivada de B171-8 (Este estudio).
- T::Gmr Cepa mutante en *bfpT* (*bfpT*::Gmr), derivada de B171-8 (Tobe et al., 1996).
- HB101 $\Delta(gpt-proA)62 leuB6 thi-1 lacY1 hsdS_B20 recA rpsL20$ (Str) *ara-14 galK2 xyl-5 mtl-1 supE44 mcrB_B* (Boyer y Roulland-Doussoix, 1969).
- SG13009 *his pyrD $\Delta lon-100 rpsL$* (Str) (Gottesmann et al., 1981).
- M15 F' *lacZM15 rpsL* (Str) (Zamenhof y Villarejo, 1972).

Plásmidos.

- pEAF Plásmido de 80 kb que contienen las cepas de EPEC (Knutton et al., 1987).
- pWKS130 Vector de clonación de bajo número de copias (Kmr); contiene el origen de replicación pSC101 (Wang y Kushner, 1991).
- pBTA-BH1 Derivado de pWKS130 que lleva un fragmento de *Bam*HI de 3.9 kb obtenido del pEAF, el cual contiene el locus *bfpTVW* y las fases de lectura abierta 3 y 4 (Tobe et al., 1996).
- pBTA-BHI-3D Derivado de pBTA-BHI que contiene el locus *bfpTVW* (Tobe et al., 1996).
- pBTA-BHI-1D Derivado de pBTA-BHI-3D que contiene *bfpT* y *bfpV* (Este estudio).
- pBTA-BHI-9P Derivado de pBTA-BHI-3D que contiene *bfpT* (Este estudio).
- pBTA-BHI-14P Derivado de pBTA-BHI-3D que contiene *bfpW* (Este estudio).
- pBTA-BHI-15D Derivado de pBTA-BHI-3D que contiene *bfpV* y *bfpW* (Este estudio).
- pBTA-BHI-16D Derivado de pBTA-BHI-9P que contiene *bfpT* truncado (carece de la región reguladora y los primeros 47 codones) (Este estudio).

- pBTA-BHI-18D Derivado de pBTA-BHI-3D que contiene el locus *bfpTVW* con *bfpT* truncado (carece de la región reguladora y los primeros 47 codones) (Este estudio).
- pMPM-K3 Vector de clonación (Kmr) que contiene el origen de replicación p15A (Mayer, 1995).
- pCS-TVW Derivado de pMPM-K3 que contiene el locus *bfpTVW* (lleva el mismo inserto que pBTA-BHI-3D) (Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados).
- pCS-VW Derivado de pCS-TVW que lleva una remoción en fase de *bfpT* (Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados).
- pCS-TW Derivado de pCS-TVW que lleva una remoción en fase de *bfpV* (Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados).
- pCS-TW2 Derivado de pCS-TVW que lleva una remoción en fase de *bfpV* (se le removieron 19 codones más que en pCS-TW) (Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados).
- pCS-TV Derivado de pCS-TVW que lleva una remoción en fase de *bfpW* (Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados).
- pCS-T Derivado de pCS-TVW que lleva una remoción en fase de *bfpV* y *bfpW* (Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados).
- pCS-T'VW Derivado de pCS-TVW que contiene el locus *bfpTVW* con *bfpT* truncado (carece de la región reguladora y los primeros 47 codones) (Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados).
- pQE32 Vector de clonación para generar fusiones de seis histidinas al extremo amino terminal de proteínas; contiene el promotor T5/lac (Ampr) (Bujard et al., 1987).
- pQE42 Vector de clonación que expresa la fusión His-DHFR con el promotor T5/lac (Bujard et al., 1987).
- pQE-BHI-9P Derivado de pQE32 que contiene *bfpT*; expresa la fusión His-BfpT (Este estudio).

- pWQE-BHI-9P Derivado de pWKS130 que contiene el inserto de pQE-BHI-9P que expresa la fusión His-BfpT (Este estudio).
- pSS9 Derivado de pACYC177 que lleva un fragmento de *HindIII* de 4.0 kb obtenido del pEAF, el cual contiene *bfpA* (Sohel et al., 1993).
- pKK232-8 Derivado de pBR322 que contiene el gen para la cloranfenicol acetil transferasa (*cat*) sin promotor (*Amp^r*) (Brosius, 1984).
- pCAT232 Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional *bfpA-cat* de los nucleótidos -232 a +76 (Puente et al., 1996).

Los plásmidos que contienen los diferentes recortes o mutaciones en la región reguladora de la fusión *bfpA-cat*, se encuentran descritos en las figuras 6 y 8.

Condiciones de crecimiento.

Los medios de cultivo Luria-Bertani (LB) o "Dulbecco's modified Eagle's medium" (DME) que contiene 0.45% de glucosa (peso/volumen) y L-glutamina (584 mg/l), sin piruvato de sodio (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, N. Y., EUA), se usaron para cultivos a 37°C, excepto cuando se indica. Una modificación reciente en la fórmula del DME, que cambió el piridoxal-HCl por piridoxina-HCl, causó un crecimiento más lento de EPEC en este medio (dato no mostrado). Para recuperar la cinética de crecimiento obtenida con la fórmula anterior, al DME se le agregó piridoxal (4 mg/l) (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, N. Y., EUA) y 1% de LB, una concentración que no afecta la expresión de *bfpA* (dato no mostrado). Cuando se indica, al DME también se le agregó sulfato de amonio (15 mM).

Las diferentes cepas se crecieron durante toda la noche en LB a 37°C. Las bacterias se concentraron por centrifugación y se resuspendieron en PBS ("phosphate-buffered saline") pH 7.4 a una densidad óptica a 600 nm de 1 (D.O._{600nm}). Esta suspensión se diluyó 1:50 en 50 ml de LB o DME y se incubó en un baño con agitación a 200 r.p.m. (Gyromax 902; Amerex Instruments, Inc., Lafayette, C.A., EUA) a las temperaturas indicadas.

Para la determinación de la curva de crecimiento (D.O._{600nm}) y la actividad de cloranfenicol acetil transferasa (CAT), se tomaron muestras de los cultivos cada hora. Durante los primeros experimentos, observamos que la expresión máxima de *bfpA-cat* se obtuvo siempre al final de la fase exponencial de crecimiento, por lo que en los experimentos posteriores, la actividad de CAT se determinó únicamente de muestras obtenidas entre las horas 6 a 9, para cultivos en DME, y de las horas 4 a 7, para cultivos en LB. En todos los casos, la máxima expresión de CAT se obtuvo entre estas horas. Muestras para la extracción de RNA (para la realización de experimentos de "primer extension") fueron tomadas donde se indica.

Técnicas de Biología Molecular.

Se utilizaron diferentes técnicas de biología molecular siguiendo protocolos establecidos (Ausubel et al., 1989; Sambrook et al., 1989). Las enzimas de modificación y restricción de DNA se obtuvieron de las compañías Boehringer Mannheim (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania) o Gibco BRL (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD., EUA) y se usaron de acuerdo a las instrucciones de los proveedores. Los nucleótidos marcados con radioactividad [γ -³²P] ATP (6000 Ci/mmol) se obtuvieron de la compañía DuPont (Du Pont NEN Research Products, Boston, MA, EUA). Los oligonucleótidos que se utilizaron para los experimentos de PCR y "primer extension", fueron sintetizados por la compañía Bio-Synthesis (Bio-Synthesis, Lewisville, TX, EUA) o por la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología/UNAM. Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen de 100 μ l, usando AmpliTaq (Perkin Elmer Corp., Branchburg, NJ, EUA) o Taq DNA polimerasa (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), siguiendo las instrucciones de los proveedores.

Determinación de la secuencia de DNA.

La secuencia de nucleótidos de todas las fusiones *bfpA-cat* que contenían recortes o mutaciones en su región reguladora, se confirmó por el método de Sanger (Sanger et al., 1977), usando el estuche de secuenciación "Thermo Sequenase cycle"

de acuerdo a las instrucciones de los proveedores (Amersham Life Science Inc., Cleveland, Ohio, EUA). El DNA de plásmido de doble cadena se usó como molde. Oligonucleótidos específicos al gen estructural *cat* y al extremo 5' de la región reguladora de *bfpA* se usaron para secuenciar ambas cadenas.

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

Los plásmidos pBTA-BHI-1D, pBTA-BHI-9P, pBTA-BHI-14P y pBTA-BHI-15D (Fig. 3) se construyeron mediante la clonación de fragmentos obtenidos a partir de pBTA-BHI, en el vector pWKS130. Los plásmidos pBTA-BHI-16D y pBTA-BHI-18D (Fig. 3) se obtuvieron mediante la remoción de un fragmento de *EcoR1*, el cual contiene la región reguladora y los primeros 47 codones de *bfpT*, de los plásmidos pBTA-BHI-9P y pBTA-BHI-3D, respectivamente. El plásmido pQE-BHI-9P se construyó mediante la clonación de un fragmento obtenido por PCR, que contenía el gen estructural de *bfpT*, en el vector pQE32 (Fig. 5). El plásmido pWQE-BHI-9P se obtuvo mediante la clonación de un fragmento de *Scal-PstI* del plásmido pQE-BHI-9P, el cual contenía *bfpT* fusionado a los codones de His y el promotor T5/lac, en el vector pWKS130 (Fig. 3).

Realización de recortes a partir del extremo 5' de la fusión *bfpA-cat*.

Los recortes del extremo 5' de la región reguladora de *bfpA-cat* se realizaron por PCR, usando como molde la fusión contenida en pCAT232 y oligonucleótidos de 18 pb complementarios al extremo 5' de cada recorte, más un oligonucleótido complementario al gen estructural *cat*. Los productos de PCR se purificaron por el sistema "Gene-Clean" y se trataron con 5U de T4 DNA polimerasa (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania), en 1X de solución amortiguadora para T4 DNA polimerasa (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania) más 100mM de dNTPs, durante 30 min a 37°C, para generar extremos rasurados. Los fragmentos de DNA se purificaron nuevamente por "Gene-Clean" y se digirieron con *HindIII*; los productos generados que contenían la secuencia de *bfpA* se aislaron y se ligaron al vector pKK232-8 (Brosius, 1984; Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Suecia)

previamente digerido con *Sma*I y *Hind*III, generándose de esta manera las fusiones *bfpA-cat*. En pCAT232, el sitio de *Hind*III está localizado en la unión de las secuencias de *bfpA* y *cat* (Puente et al., 1996).

Determinación de la expresión de CAT.

El ensayo de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) se realizó como se describió anteriormente (Puente et al., 1996), con ligeras modificaciones. Para preparar el extracto crudo, las bacterias se concentraron por centrifugación (16 000 x g) y se lavaron con 1 ml de solución TDTT (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, y 30 μ M DL-dithiothreitol). La pastilla de células se resuspendió en 500 μ l de TDTT y se sonicaron 30 segundos en hielo. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación (16 000 x g) durante 5 min a 4°C y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios.

Para la determinación de CAT, 5 μ l de cada extracto se colocaron por duplicado en una placa de ELISA de 96 pozos, seguido de 200 μ l de la mezcla de reacción que contenía: 1 mM DNTB (5,5'-dithio-bis(2-ácido nitrobenzoico) (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania)/0.1 mM acetyl-CoA (Pharmacia Biotech Inc., Alameda, CA, EUA)/0.1 mM cloranfenicol (Sigma Chemical Company, ST Louis, MO, EUA) en 0.1 M de Tris-HCl pH 7.8. Los cambios en absorbancia a 410 nm se registraron cada 5 seg durante 3 min, usando un lector de microplacas ("Scanning Autoreader and Microplate Workstation, Ceres 900 C") y el programa KC3™ para la determinación de cinéticas. Las actividades se obtuvieron por interpolación con una curva estándar compuesta de concentraciones de 0 a 2500 U/ml de la enzima cloranfenicol acetil transferasa purificada (Sigma Chemical Company, ST Louis, MO, EUA).

Las concentraciones de proteína de los extractos usados en el ensayo de CAT se determinaron con un estuche para cuantificación de proteínas (Pierce, Rockford, IL, EUA). Las concentraciones se obtuvieron por la interpolación con una curva estándar compuesta de concentraciones de 0.1 a 1.5 mg/ml de albúmina de suero de bovino. Estos valores se usaron para calcular la actividad específica de CAT.

Mutagénesis al azar por PCR.

La mutagénesis al azar se realizó en cuatro diferentes condiciones que introducen mutaciones durante la amplificación por PCR, como se ha descrito anteriormente (Leung et al., 1989). Brevemente, el fragmento de DNA *Bam*HI-*Hind*III de pCAT232, que contiene la región reguladora de *bfpA*, se amplificó con oligonucleótidos complementarios a los genes *bla* (*Amp*^r) y *cat* por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 48°C por 1 min y 70°C por 1 min. Las cuatro reacciones de PCR contenían 100 ng de DNA de pCAT232 y 1 pmol de cada oligonucleótido. La primera reacción contenía también 1X de solución amortiguadora para la reacción de Taq DNA polimerasa, libre de magnesio (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA); más 0.5 mM de MnCl₂; 6.1 mM de MgCl₂; 10 mM de β-mercaptoetanol (β-ME); 10 μl de dimetil sulfóxido (DMSO); 1 mM de cada uno de los nucleótidos dGTP, dCTP, y dTTP; 0.2 mM de dATP; y 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA). En la segunda mezcla de reacción se omitió el β-ME y el DMSO. La tercera mezcla de PCR fue similar a la primera, excepto que las concentraciones de dCTP y dATP se cambiaron a 0.2 mM y 1 mM, respectivamente. La cuarta mezcla representó una condición normal para PCR, conteniendo 1.5 mM de MgCl₂ y 0.2 mM de cada uno de los nucleótidos, sin MnCl₂, β-ME y DMSO. Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 100 μl. Los productos de PCR se purificaron de gel, usando un estuche de purificación para fragmentos de DNA (GeneClean; Bio 101. Inc., La Jolla, CA, EUA), digeridos con *Bam*HI y *Hind*III, y clonados en el vector pKK232-8 digerido con las mismas enzimas, para generar las fusiones *bfpA-cat*. Las ligaciones se transformaron en *E. coli* MC4100 que contenía el plásmido pBTA-BHI, el cual lleva el locus *bfpTVW* (Tobe et al., 1996). Los plásmidos obtenidos con cada condición de PCR se nombraron pMNA (primera), pMNB (segunda), pMNC (tercera) y pMG (cuarta), respectivamente.

Para seleccionar las mutaciones que afectan la expresión de *bfpA*, se aprovechó que la expresión de *bfpA-cat* produce resistencia a cloranfenicol (Cm). Para aislar mutaciones que disminuyen la expresión de *bfpA-cat*, las transformantes se sembraron primero en placas de LB con 100 μg/ml de ampicilina (*Amp*) y 40 μg/ml

de kanamicina (Km). Las colonias obtenidas se replicaron posteriormente en placas de LB con las mismas concentraciones de Amp y Km más 200 µg/ml de Cm. Un experimento de titulación que se realizó previamente, mostró que concentraciones de hasta 300 µg/ml de Cm no inhiben el crecimiento de colonias que contienen la fusión silvestre (pCAT232), cuando éstas se resiembran de placas de LB que no contienen Cm (dato no mostrado); así, las colonias sensibles a 200 µg/ml de Cm se seleccionaron para una mayor caracterización. Un total de 560 colonias sensibles a Cm se obtuvieron de las cuatro diferentes reacciones de PCR (225, 134, 162 y 39, respectivamente). El DNA de plásmido se purificó de 150 colonias después de crecerlas en LB y la presencia de inserto en pKK232-8 se determinó por PCR mediante la amplificación del fragmento *Bam*HI-*Hind*III, como se describió anteriormente. La actividad de CAT se determinó para 100 colonias que tuvieron inserto en pKK232-8 y de acuerdo a ésta, se eligieron 46 colonias para la secuenciación del inserto. Los plásmidos que tuvieron mutaciones diferentes en la región reguladora de *bfpA* (Fig. 8), se introdujeron a EPEC B171-8 para evaluar nuevamente su actividad.

Para aislar mutaciones que incrementan la expresión de *bfpA*, las transformantes se sembraron directamente en placas de LB con 100 µg/ml de Amp, 40 µg/ml de Km y 150 µg/ml de Cm. Contrario a lo descrito arriba, cuando bacterias que contenían la fusión silvestre (pCAT232) se siembran directamente en Cm, concentraciones arriba de 100 µg/ml fueron inhibitorias para su crecimiento (dato no mostrado). Así, las 39 colonias que se obtuvieron de las cuatro distintas condiciones de PCR (9, 16, 10 y 4, respectivamente), fueron candidatas para contener mutaciones que incrementan la expresión de *bfpA-cat*. Esto se confirmó por la determinación de la actividad de CAT en medio LB líquido. El DNA de los plásmidos de todas las colonias se purificó y la región reguladora de las fusiones *bfpA-cat* se secuenció. Los plásmidos que tuvieron mutaciones diferentes (Fig. 8), se introdujeron a EPEC B171-8 para evaluar su actividad de CAT.

Mutagénesis sitio-dirigida por PCR.

Las mutaciones en el promotor de *bfpA*, contenidas en los plásmidos pSNE10-232 y pSAW10 (Fig 6), se construyeron a partir de pCAT232 por la técnica de PCR-ligación-PCR (PLP) descrita por Ali y Steinkasserer (1995). Los oligonucleótidos mutagénicos que se usaron fueron 5'-AATATTATTCCGTGACCTAT-3' y 5'-AAGATTAGTCCGTGACCTAT-3' (los nucleótidos que se cambiaron con respecto a la secuencia silvestre están subrayados).

Purificación de RNA y experimento de extensión del iniciador ("primer extension").

Para la obtención de RNA se tomaron muestras de cultivos en DME a 37°C, después de 4 horas de crecimiento en fase exponencial. El RNA se purificó usando un estuche para purificación de RNA (RNeasy kit; Qiagen Inc., Chatsworth, CA, EUA), de acuerdo a las instrucciones de los proveedores. La concentración y calidad del RNA se determinó mediante la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm. Las reacciones de "primer extension" se realizaron con una modificación del método reportado por Barrios et al. (1995). Los oligonucleótidos complementarios a los genes estructurales de *cat* (5'-CGGTGGTATATCCAGTGAT-3') o *bfpA* (5'-GCACCATTGCAGATTCAA-3'), se usaron para determinar el extremo 5' de los transcritos de RNAm originados de la fusión *bfpA-cat* y del gen silvestre *bfpA*, respectivamente. 20 pmol de cada oligonucleótido se marcaron radioactivamente con 25 µCi de [γ -³²P] ATP, usando 10U de T4 polinucleótido cinasa (Amersham Life Science, Inc., Cleveland, OH, EUA), en 1X de solución amortiguadora para T4 polinucleótido cinasa (Amersham Life Science, Inc., Cleveland, OH, EUA). 1 pmol del oligonucleótido marcado se hibridó con 15 µg de RNA total, en 0.2 M NaCl-0.03 M Tris-HCl (pH 7.5), calentándose 3 min a 90°C y después enfriándose lentamente hasta 42°C. Las reacciones de transcripción reversa se realizaron a 45°C durante 1 hora con 10 U de la enzima transcriptasa reversa AMV ("avian myeloblastosis virus") (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania), en solución amortiguadora para la reacción con AMV más 1mM de DTT, 0.27 mM de cada uno de los nucleótidos

y 50 U de inhibidor de RNAsa (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania), en un volumen final de 37 μ l. Los productos de cDNA se purificaron y concentraron usando un concentrador microcon-10 (Amicon Inc., Beverly, MA, EUA), siguiendo las especificaciones de los proveedores. Las secuencias patrón se generaron con los mismos oligonucleótidos, usando como molde los plásmidos pCAT232 (que contiene la fusión *bfpA-cat*) y pSS9 (que contiene el gen *bfpA*) (Sohel et al., 1993). A las reacciones se les agregó solución de electroforesis y los productos se desnaturalizaron por calentamiento a 95°C durante 5 min y se analizaron en geles de secuencia (poliacrilamida 8%-urea 8M).

Determinación de secuencias que inducen doblamientos en el DNA.

El análisis de secuencias que inducen doblamientos en la región reguladora de *bfpA* se realizó por un método basado en PCR, como se describió anteriormente (Valle, 1994). Brevemente, ocho fragmentos de 200 pb, que cubren la región reguladora de *bfpA* de las posiciones -374 a -175, -334 a -135, -294 a -95, -214 a -15, -174 a +26, -134 a +66, -94 a +106 y -54 a +146, respectivamente, se obtuvieron por PCR, usando oligonucleótidos de 18 pb y el plásmido pSS9 (que contiene el gen *bfpA*) como molde. Los fragmentos obtenidos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, a 40°C en TBE 1X con 100 V. El DNA se detectó mediante la tinción con bromuro de etidio. Para localizar el centro de doblamiento en la región comprendida por los ocho fragmentos, la movilidad relativa de cada fragmento en el gel se graficó, contra la posición del nucleótido central, con respecto al inicio de la transcripción de *bfpA*.

RESULTADOS

BfpT activa la transcripción de *bfpA*.

El papel del locus *bfpTVW* en la regulación de *bfpA*, así como de otros factores de virulencia de EPEC, no ha sido claramente definido. Nuestras primeras observaciones indicaron que el locus *bfpTVW*, localizado 6.7 kb corriente abajo del conjunto de genes *bfp*, en el plásmido EAF, codifica para el activador transcripcional de *bfpA* (Tobe et al., 1996; Apéndice I). Este locus contiene los genes *bfpT*, *bfpV* y *bfpW*, los cuales forman un operón (M. G. Sosa, datos no publicados).

Puesto que la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica de *bfpT* (274 aminoácidos), presentaba homología con las proteínas que forman la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS, fue posible sugerir que *bfpT* codificaba para el activador transcripcional de *bfpA*. Por otro lado, la secuencia de aminoácidos deducida de *bfpV* (130 aminoácidos) y *bfpW* (90 aminoácidos), segundo y tercer gen del operón, respectivamente, no presentaron homología significativa con alguna proteína reportada a la fecha. Sin embargo, otros experimentos mostraron que la expresión de *bfpA* en una cepa de EPEC, con una inserción de un casete de gentamicina en *bfpT* (EPEC T::Gmr), sólo se complementa con un plásmido que contiene el operón completo, al igual que en una cepa de EPEC curada del plásmido EAF. Estos resultados sugirieron que la máxima eficiencia de transcripción de *bfpA* requiere de los tres genes, *bfpT*, *bfpV* y *bfpW* (Tobe et al., 1996; Apéndice I).

Sin embargo, en *E. coli* HB101 crecida en LB, plásmidos que contienen únicamente *bfpT* (pBTA-BH1-9P y pWQE-BH1-9P) activaron la fusión transcripcional *bfpA-cat* (contenida en el plásmido pCAT232), incluso a un nivel mayor que plásmidos que llevan *bfpT* y *bfpV* (pBTA-BH1-1D) o los tres genes (pBTA-BH1 y pBTA-BH1-3D) (Fig. 3). Los mismos resultados se obtuvieron en una cepa de EPEC curada del plásmido EAF, utilizando plásmidos derivados de pCS-TVW (ver Materiales y Métodos), los cuales contienen el locus *bfpTVW* con diferentes modificaciones, que incluyen la remoción en fase de uno o dos de los tres genes

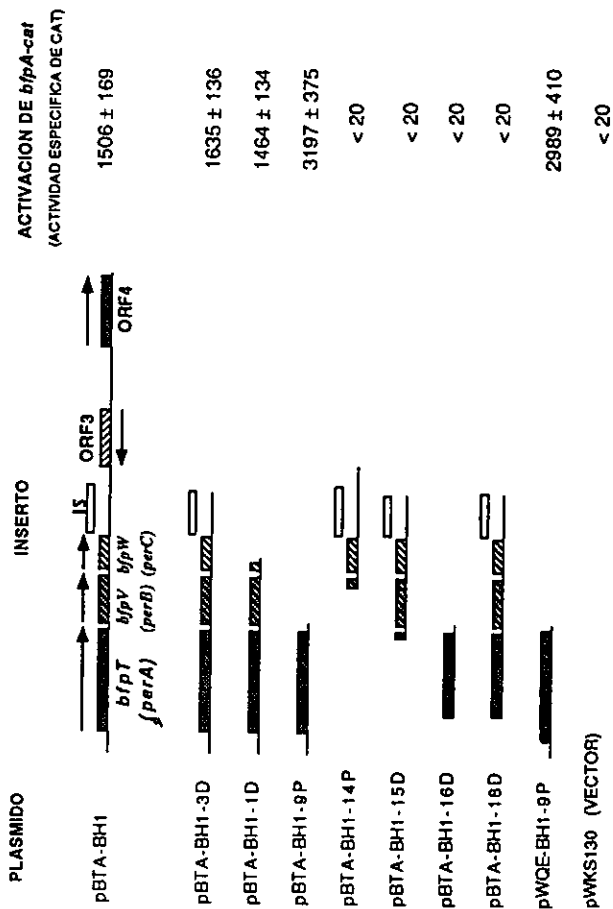


Fig. 3. Activación de la transcripción de *bfpA* por BfpT, en una cepa de *E. coli* no enteropatógena. La capacidad de activar la expresión de la fusión *bfpA-cat*, contenida en pCAT232, de plásmidos que llevan los diferentes genes del locus *bfpTVW*, fue evaluada en *E. coli* HB101 crecida en LB a 37°C. Los plásmidos pBTA-BH1-16D y pBTA-BH1-18D contienen al gen *bfpT* incompleto, ya que carece de la región reguladora y de los primeros 47 codones. En todos los plásmidos la dirección de la transcripción de los genes está a favor del promotor T3/lac presente en el vector. El plásmido pWQE-BH1-9P expresa la fusión His-BfpT a partir del promotor T5/lac. La figura muestra la actividad específica de CAT obtenida a la hora 5 de crecimiento. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

(Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados). Así, estos resultados nos llevaron a reevaluar si el producto de *bfpT* (BfpT) era el único que se requería para complementar la expresión de *bfpA* en la cepa de EPEC mutada en *bfpT*.

La cepa de EPEC T::Gmr se transformó con los plásmidos a los cuales se les removió en fase uno o dos de los tres genes del locus *bfpTVW* (ver Materiales y Métodos). La capacidad de los genes contenidos en estos plásmidos de restaurar la expresión de *bfpA*, se determinó mediante la detección de su transcrito por reacciones de "primer extension", utilizando un oligonucleótido complementario a la secuencia del gen estructural (Fig. 4). Para la realización de estos experimentos, se purificó RNA de las cepas transformadas con los diferentes plásmidos, las cuales se crecieron en DME a 37°C, que son condiciones óptimas para la expresión de *bfpA* (Puente et al., 1996). Como se esperaba, no se detectó RNAm de *bfpA* en la cepa T::Gmr transformada con el vector (Fig. 4A, carril 2). Con los plásmidos que llevan *bfpT*, solo o junto con *bfpV* y/o *bfpW*, se restauró la transcripción de *bfpA* (Fig. 4A; carriles 3, 5, 6, 7 y 8). Por el contrario, el plásmido que contiene únicamente los genes *bfpV* y *bfpW* no complementó su expresión (Fig. 4A, carril 4). Los niveles del RNAm de *bfpA* en cepas complementadas por plásmidos que contienen *bfpT* pero no *bfpV*, fueron mayores a los expresados en la cepa que contiene el operón completo o en la cepa silvestre (Fig. 4A; carriles 1, 3, 5, 6 y 8). De las mismas muestras de RNA que se usaron para detectar el RNAm de *bfpA*, se hicieron reacciones de "primer extension" para detectar el RNA ribosomal 16S, expresado a partir del promotor P1 del operón *rrnA*. Los resultados mostrados en la figura 4B, indican que los resultados de la figura 4A no son debidos a la cantidad o integridad del RNA utilizado para el ensayo. En conjunto, estos resultados mostraron que BfpT es el único producto del locus *bfpTVW* que se requiere para inducir óptimamente la transcripción de *bfpA*. Además, sugieren que *bfpV* participa como modulador negativo, ya que en su ausencia se incrementa la expresión de *bfpA* dependiente de BfpT (Figs. 3 y 4 y Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados).

Después de nuestro primer estudio, hemos construido un gran número de plásmidos que contienen *bfpT*, ya sea generando fragmentos por PCR o mediante la



Fig. 4. Activación de la transcripción de *bfpA* por *BfpT*, en EPEC. (A) La expresión de *bfpA* fue analizada por "primer extension", usando 10 μ g de RNA total purificado de muestras de cultivos en DME a 37°C, de la cepa EPEC T::Gmr (mutante en *bfpT* derivada de B171-8) conteniendo los plásmidos que llevan los diferentes genes del locus *bfpTVW*. (B) Reacciones de "primer extension" realizadas con 3 μ g de las mismas muestras de RNA, para detectar el RNA ribosomal 16S, expresado a partir del promotor P1 del operón *rna*. Las muestras de RNA fueron las siguientes: 1- EPEC B171-8 (1); EPEC T::Gmr transformada con pMPM-K3 (2), pCS-TVW (3), pCS-VW (4), pCS-TW (5), pCS-TW2 (6), pCS-TV (7), pCS-T (8) y pCS-TVW (9). El plásmido pCS-TVW contienen al gen *bfpT* incompleto ya que carece de la región reguladora y de los primeros 47 codones. En todos los plásmidos la dirección de la transcripción de los genes está a favor del promotor T3/lac presente en el vector.

digestión de otros plásmidos que contienen el gen silvestre. Durante la caracterización de estos plásmidos, notamos la aparición frecuente de mutaciones, tanto en la región reguladora como en el gen estructural, las cuales evitan la expresión de *bfpT*. La mutación que se genera en la región estructural es una inserción de una G en un trecho de 7 G's, localizado entre los codones 36 a 38, la cual produce un cambio de fase en *bfpT*. Plásmidos que llevan *bfpT* con dicha mutación no inducen la expresión de *bfpA* (Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados). Es importante señalar que esta mutación pudo haberse generado inadvertidamente en algunos de los plásmidos que utilizamos en nuestro primer estudio (plásmidos que contienen *bfpT* o *bfpT* y *bfpV*), lo cual pudo llevarnos, en un principio, a interpretar que se requería del locus *bfpTVW* completo para la máxima eficiencia de transcripción de *bfpA* (Tobe et al., 1996; Apéndice I).

El locus *bfpTVW* ha sido descrito en forma independiente como locus *perABC* (Gómez-Duarte y Kaper, 1995). Su aislamiento se basó en la obtención de fragmentos del plásmido EAF que inducían la expresión del gen *eaeA*, que codifica para la intimina, la cual es necesaria para la adherencia íntima de EPEC con las células epiteliales (Jerse et al., 1990). Aunque inicialmente se postuló que *perC* (*bfpW*) era el principal activador de la expresión de *eaeA* en una cepa de EPEC curada del plásmido EAF, en diferentes trabajos posteriores se implica a PerA (BfpT) como el activador de la expresión, tanto de *eaeA* como de los genes *esp*, los cuales codifican para proteínas que secreta EPEC durante la interacción con las células epiteliales (Gómez-Duarte y Kaper, 1995; Kenny y Finlay, 1995; Kenny et al., 1997(a)). La presunta participación de PerA (BfpT) en la activación de genes localizados en la región LEE, está basada en experimentos realizados con un plásmido (similar a los plásmidos pBTA-BH1-18D y pCS-T'VW) que lleva el locus *perABC* (*bfpTVW*) incompleto, donde el gen *perA* (*bfpT*) carece de la secuencia que codifica para los primeros 47 codones, pero es capaz de aumentar la expresión de los genes *eaeA* y *esp*. Aunque la expresión de *eaeA* puede ser inducida con un plásmido que contiene únicamente *perC* (*bfpW*), los niveles de expresión inducidos con el plásmido que contiene el locus *perABC* (*bfpTVW*) incompleto son seis veces mayores (Gómez-

Duarte y Kaper, 1995).

En nuestro estudio, los plásmidos que contienen truncado el gen *bfpT* (sin los primeros 47 codones) no activaron la expresión de *bfpA*, lo cual sugiere que a partir de éstos no se produce la proteína BfpT funcional (Fig. 3, plásmidos pBTA-BH1-16D y pBTA-BH1-18D; Fig. 4A, plásmido pCS-TVW, carril 9). Así, el aumento que obtuvieron otros autores en los niveles de expresión de los genes *eaeA* y *esp*, con el plásmido que contiene el locus *bfpTVW* incompleto, parece no ser inducido por BfpT, aunque no podemos descartar una función para la proteína truncada. Por lo tanto, si bien se ha mostrado que el locus *bfpTVW* (*perABC*) es necesario para activar la expresión de los genes *bfp*, *eae* y *esp*, la activación de dichos genes podría llevarse a cabo por diferentes mecanismos; por ejemplo, BfpT activando la expresión de los genes *bfp* y BfpW activando la expresión de los genes *eae* y *esp*. Esta hipótesis está siendo analizada actualmente.

Purificación de BfpT.

Los experimentos anteriormente descritos claramente indicaron que BfpT es el activador transcripcional de *bfpA*. Para poder realizar ensayos de interacción proteína/DNA (geles de retardamiento, "footprinting", etc.), con el objetivo de determinar la secuencia de DNA que reconoce BfpT en la región reguladora de *bfpA*, se probaron diferentes sistemas para sobre-exresar y purificar este activador. Lo primero que se probó fue el sistema de purificación por columnas de resina Ni-NTA, el cual se basa en la alta afinidad que tienen los residuos de histidina por el níquel contenido en la resina (Manual "The QIAexpressionist", QIAGEN). Con este sistema, la proteína de interés se fusiona por uno de sus extremos a un trecho de seis histidinas, lo cual permite su purificación de manera fácil y rápida. Para esto, se construyó el plásmido pQE-BH1-9P, que expresa BfpT fusionada a seis histidinas en su extremo amino terminal. La funcionalidad de esta fusión se determinó por su capacidad de activar la expresión de *bfpA-cat.*. Para esto, el fragmento de pQE-BH1-9P, que codifica para His-BfpT, se clonó en el vector pWKS130 generando el plásmido pWQE-BH1-9P, el cual es compatible con el plásmido que contiene la fusión *bfpA-cat.* El

plásmido pWQE-BH1-9P se transformó en la cepa HB101 que contenía pCAT232 y se determinó la actividad de CAT de un cultivo crecido en LB. La fusión His-BfpT activó la expresión de *bfpA-cat* a los mismos niveles que BfpT silvestre (Fig. 3, plásmidos pWQE-BH1-9P y pBTA-BH1-9P). Estos resultados mostraron que la fusión al trecho de histidinas no altera la actividad biológica de BfpT.

Una vez probada su actividad, el plásmido pQE-BH1-9P se introdujo en cepas que adicionalmente contenían el plásmido pREP4, que codifica para el represor de *lac*, el cual mantiene inactiva la expresión de la fusión His-BfpT, que está bajo el control del promotor T5/*lac*, hasta el momento de la inducción por IPTG. En la figura 5 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos después de probar diferentes condiciones de expresión, como son: diferentes temperaturas de incubación, diferentes concentraciones de IPTG para la inducción, y el uso de inhibidores de proteasas. En geles de poliacrilamida, la fusión His-BfpT no se detectó ni en el extracto de proteínas totales de un cultivo inducido con IPTG, ni en las fracciones que se obtuvieron de la columna de Ni-NTA después de pasar este extracto (Fig. 5). En cambio, la fusión His-DHFR, que se recomienda usar como control de expresión, se observó en el extracto total y se obtuvo como proteína única en la fracción que se desprendió de la columna (Fig. 5).

A la fecha, hemos probado diferentes sistemas de expresión y purificación para BfpT, utilizando diferentes tipos de fusiones, promotores y cepas, sin que se haya logrado detectar su expresión (Tabla 2, Apéndice II). Aun en experimentos de expresión con la RNA polimerasa T7 y marcando las proteínas sintetizadas con radioactividad, el producto de *bfpT* no se ha observado (M. G. Sosa, datos no publicados).

Análisis genético de la región reguladora de *bfpA*.

La realización de ensayos de interacción proteína/DNA *in vitro*, para determinar la secuencia que reconoce BfpT, se ha dificultado debido a que no se ha logrado purificar esta proteína. Como alternativa para localizar el sitio de unión de BfpT, así como otras secuencias importantes para la regulación de *bfpA*, se llevó a cabo un

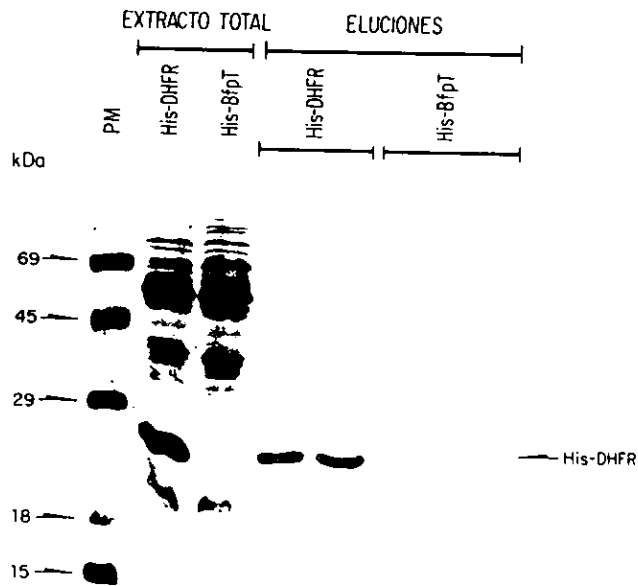


Fig. 5. Expresión de las fusiones His-BfpT y His-DHFR. A partir de muestras de cultivos, realizados en condiciones de inducción, de la cepa SG13009 transformada con los plásmidos pQE-BHI-9P y pQE42, se obtuvieron extractos totales de proteínas, así como la fracción que se desprendió de las columnas de níquel (ver Materiales y Métodos), las cuales se separaron en geles de poliacrilamida al 12.5%. El plásmido pQE-BHI-9P expresa la fusión His-BfpT y el plásmido pQE42 expresa la fusión His-DHFR.

Tabla 1. Sistemas de expresión y purificación probados para expresar BfpT.

Sistema	Tipo de fusión	Tipo de purificación	Tipo de promotor	Cepa en que se expresó
I	His-BfpT	Por columnas de níquel	T5/lac	SG13009(pREP4) M15(pREP4)
II	His-DHFR-BfpT	Por columnas de níquel	T5/lac	SG13009(pREP4) M15(pREP4)
III	Tag-BfpT	Por anticuerpos contra T7-Tag	T7	BL21(DE3)
IV	Tag-BfpT-His	Por anticuerpos contra T7-Tag o por columnas de níquel	T7	BL21(DE3)
V	GST-BfpT	Por columnas de glutatión sefarosa	tac	SG13009(pREP44) JM109

análisis genético de la región reguladora de este gen (Apéndice III), el cual consistió de lo siguiente:

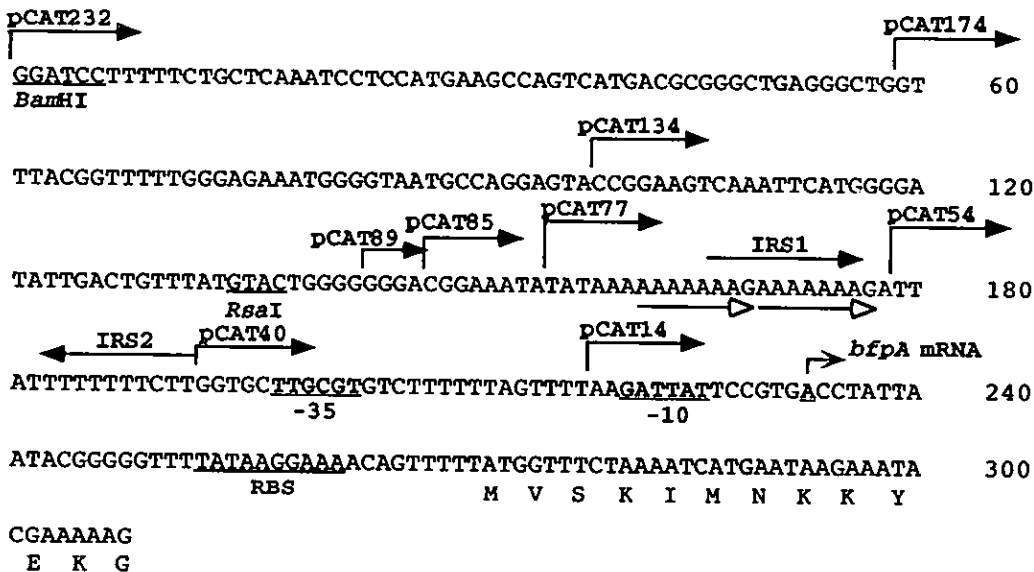
a)- Análisis de recortes a partir del extremo 5' de la región reguladora de *bfpA*.

En un estudio previo se había demostrado que la fusión *bfpA-cat* contenida en pCAT232, lleva todos los elementos requeridos para la expresión de *bfpA* (Puente et al., 1996). Esta fusión contiene un fragmento de la región reguladora de *bfpA* que abarca los nucleótidos de las posiciones -232 a +76, con respecto al inicio de la transcripción. El análisis de la secuencia nucleotídica de este fragmento reveló la presencia de varios elementos que pudieran ser importantes para la expresión de *bfpA*, como son secuencias -10 y -35 que se han propuesto como elementos del promotor dependiente de σ -70 y una región rica en A-T, la cual contiene secuencias repetidas invertidas y directas (Fig. 6A) (Puente et al., 1996).

Para definir mejor la región reguladora de *bfpA*, se realizaron recortes a partir del extremo 5' de la fusión *bfpA-cat* contenida en pCAT232. Los recortes se generaron mediante la amplificación por PCR de los fragmentos correspondientes y su posterior clonación en el vector pKK232-8, el cual contiene el gen *cat* que carece de promotor (ver Materiales y Métodos). La secuencia nucleotídica de todos los insertos clonados se determinó para confirmar la posición precisa del recorte y para asegurarnos de que no se hubieran generado mutaciones por el PCR. Los plásmidos que se obtuvieron fueron numerados de acuerdo a la posición del nucleótido hasta donde se hizo el recorte, con respecto al inicio de la transcripción (Fig. 6A). La actividad de CAT producida por los plásmidos que contienen las fusiones *bfpA-cat* se determinó en EPEC B171-8 crecida en medio DME a 37°C, las cuales son condiciones óptimas para la expresión de *bfpA*, y en condiciones que se sabe que regulan su expresión, como son: crecimiento en LB a 37°C, en DME a 25°C y 39°C, y en DME conteniendo 15mM de sulfato de amonio a 37°C (Puente et al., 1996).

La fusión *bfpA-cat* recortada hasta la posición -85 (pCAT85) expresó niveles similares de CAT y presentó el mismo patrón de regulación (por temperatura, amonio y medio de crecimiento) que otras fusiones con más secuencia corriente arriba;

A



B

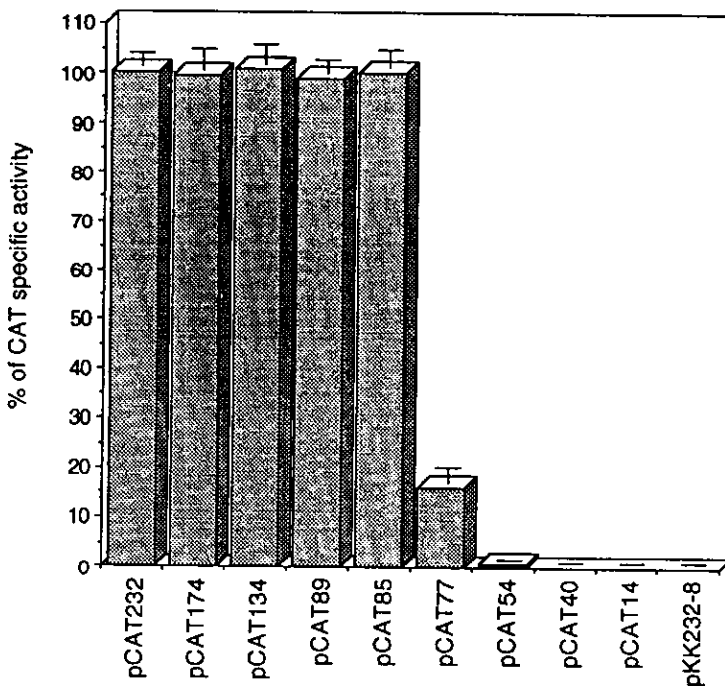


Fig. 6. Expresión de las fusiones *bfpA-cat* que contienen recortes en el extremo 5' de su región reguladora. **(A)** Secuencia de nucleótidos de la región reguladora de *bfpA*. Las posiciones a las cuales se recortó cada fusión, se indican por flechas que tienen arriba el nombre del plásmido que la contiene. El número de cada plásmido corresponde a la posición del punto de recorte, con respecto al inicio de la transcripción. Las secuencias -10 y -35 del promotor propuesto para *bfpA* se encuentran marcadas en negrillas y subrayadas. La posición correcta del inicio de transcripción (este estudio, fig. 8) se encuentra también marcada en negrilla y con una pequeña flecha (*bfpA* mRNA). Secuencias repetidas invertidas (IRS1 e IRS2) y directas, localizadas en el trecho de A-T, están indicadas por flechas horizontales arriba o abajo de la secuencia, respectivamente. **(B)** La expresión de CAT de cada fusión fue evaluada en EPEC B171-8 crecida en DME a 37°C. Las muestras fueron tomadas cada hora y la máxima actividad específica de CAT, alcanzada por cada fusión está graficada como el porcentaje de la actividad específica máxima expresada por la fusión contenida en pCAT232. Los datos representan el promedio y la desviación estándar obtenidos con al menos tres experimentos independientes.

mientras que la fusión recortada hasta la posición -77 (pCAT77) mantuvo sólo el 16% de la actividad de CAT, aunque mostró el mismo patrón de regulación que la fusión silvestre (pCAT232) (Figs. 6B y 7). Además, la expresión de las fusiones arriba mencionadas fue dependiente de BfpT, ya que no se detectó actividad de CAT cuando éstas fueron expresadas en la cepa de EPEC T::Gmr (Fig. 7). En contraste, únicamente niveles basales de expresión se detectaron para las fusiones con recortes a las posiciones -54 o -40 (pCAT54 o pCAT40), las cuales contienen aún intacto el promotor (Fig. 6B). Estos resultados indicaron que la secuencia comprendida entre las posiciones -85 a -54 se requiere para la expresión de *bfpA*, dependiente de BfpT.

b)- Mutagénesis de la región reguladora de *bfpA*.

Para determinar específicamente qué nucleótidos de la región reguladora son importantes para la expresión de *bfpA*, se realizó una mutagénesis al azar en la región reguladora de *bfpA* contenida en el plásmido pCAT232 (fusión *bfpA-cat*). Dicha región se amplificó en cuatro condiciones de PCR que introducen mutaciones a diferente frecuencia, como se ha descrito previamente (Leung et al., 1989; ver Materiales y Métodos). Los productos de PCR se clonaron en el vector pKK232-8 (Amp^r) para generar fusiones *bfpA-cat* y los plásmidos resultantes se transformaron en *E. coli* MC4100 que contenía el plásmido pBTA-BH1 (Km^r), el cual lleva el locus *bfpTVW* (Fig. 3).

Como se describe en Materiales y Métodos, mutaciones que reducen la expresión de *bfpA-cat* se identificaron en colonias que no crecieron en una concentración de cloranfenicol, en la que sí crecieron colonias que contenían la fusión silvestre (pCAT232); mientras que mutaciones que aumentan la expresión se identificaron en colonias que crecieron en una concentración de cloranfenicol que no permitió el crecimiento de aquéllas que contenían la fusión silvestre. El fenotipo de las colonias seleccionadas se confirmó mediante la determinación de los niveles de expresión de CAT para cada uno de ellos. Los plásmidos de estas colonias se purificaron y la secuencia de la región reguladora de *bfpA* se determinó.

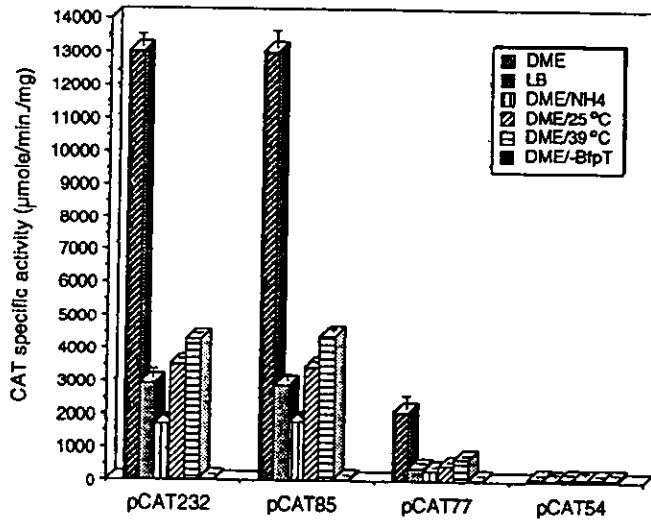


Fig. 7. Regulación de las fusiones *bfpA-cat* que contienen recortes en el extremo 5' de su región reguladora, en respuesta a señales ambientales. La expresión de las fusiones contenidas en pCAT232, pCAT85, pCAT77 y pCAT54, fue evaluada en EPEC B171-8 crecida en DME a 37°C, 25°C y 39°C; o en LB a 37°C; o en DME que contiene 15 mM de sulfato de amonio, a 37°C; o en EPEC T::Gmr, en DME a 37°C. La gráfica muestra la máxima actividad específica de CAT alcanzada durante el cultivo. Los datos representan el promedio y la desviación estándar obtenidos con al menos tres experimentos independientes.

Los plásmidos que tuvieran mutaciones diferentes en *bfpA-cat* se transformaron en EPEC B171-8 para determinar la actividad de CAT en cultivos crecidos en LB a 37°C. Las mutaciones identificadas se clasificaron de acuerdo a su efecto en la expresión y a su localización en la región reguladora de *bfpA*. De esta manera, mutaciones localizadas corriente arriba del promotor que disminuyeron o aumentaron la expresión de *bfpA-cat*, se clasificaron como mutaciones negativas o positivas (“down” o “up”), respectivamente, y como mutaciones en el promotor aquéllas localizadas en las regiones -10 y -35, sin importar su efecto (Fig. 8). Cada una de las mutaciones que se describen a continuación se obtuvo en cuando menos dos de las cuatro diferentes condiciones mutagénicas de PCR utilizadas.

Mutaciones en el promotor. Un total de tres fusiones *bfpA-cat* con mutaciones en el promotor, que apagaron totalmente su expresión, se obtuvieron y caracterizaron. Una presentó un cambio de T por C en la posición -35 (pMG72), y las otras dos tuvieron un cambio de G por A en la posición -33, combinada con un cambio de T por C en la posición -44 o -10 (pMNC56 y pMNC52, respectivamente) (Fig. 8). Los cambios en las posiciones -35 o -33 redujeron la identidad de esta región con respecto al consenso de la región -35 de los promotores de *E. coli* dependientes de σ^{-70} ; mientras que el cambio en la posición -10 redujo la identidad de esta región con la secuencia consenso de la región -10. La mutación en la posición -44 probablemente no tenga ningún efecto, ya que este cambio no afectó la expresión de fusiones que contienen mutaciones positivas (“up”) (Fig. 8, comparar la expresión de pMG1 con pMNA6 y pMNB2).

Para caracterizar mejor el promotor de *bfpA*, se realizaron independientemente dos mutaciones sitio-dirigidas en la región -10 de la fusión *bfpA-cat*, las cuales se generaron por PCR usando como molde pCAT232. Un cambio de T por G en la posición -7 (pSAW10), que reduce la identidad de esta región con la secuencia consenso de la región -10, apagó completamente la expresión de *bfpA-cat*, mientras que un cambio de G por T en la posición -12 (G-12T, pSNE10-232), que aumenta la identidad de esta región con la secuencia consenso de la región -10, incrementó 2.3 veces la expresión de la fusión en todas las condiciones de crecimiento probadas,

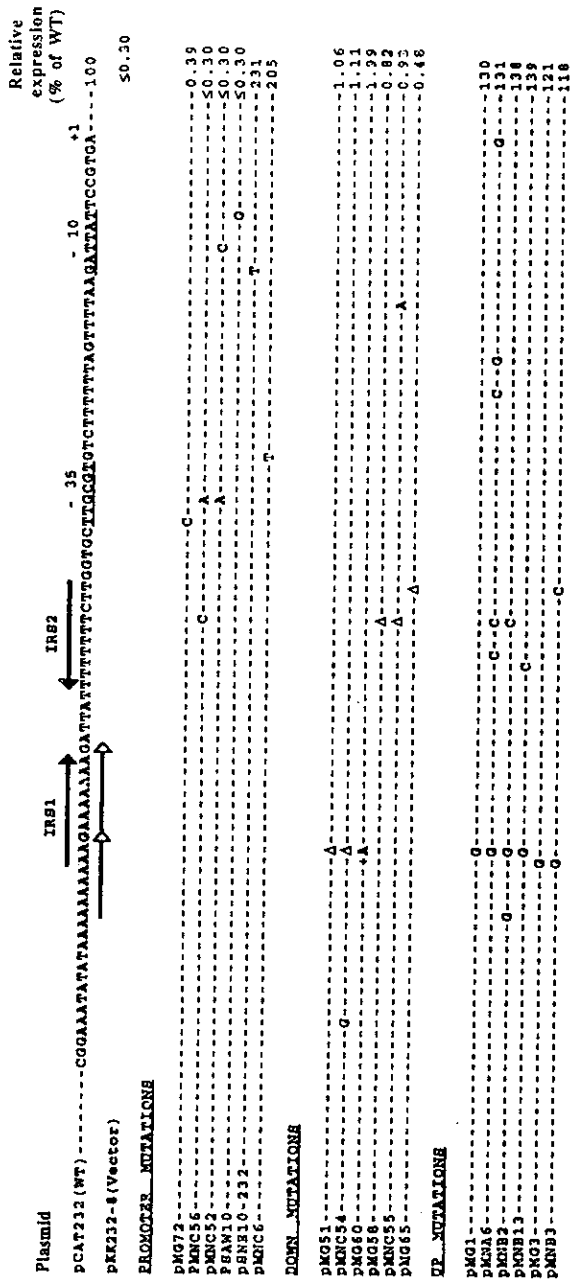


Fig. 8. Mutaciones en la región reguladora de *bfpA*, generadas por mutagénesis al azar o sitio dirigida, realizadas por PCR. La secuencia de nucleótidos que se muestra corresponde a la región reguladora de *bfpA*, de las posiciones -85 a +1. Las secuencias repetidas invertidas (IRS1 e IRS2) o directas están indicadas por flechas arriba o abajo de la secuencia, respectivamente. Las secuencias -10 y -35 del promotor están subrayadas y el inicio de la transcripción está indicado como +1. Las mutaciones están mostradas abajo de la secuencia silvestre: nucleótidos de la secuencia silvestre (-), remociones (Δ), inserciones (+). Todas las mutaciones fueron generadas por mutagénesis al azar, excepto aquellas contenidas en pSAW10 y pSNE10-232, las cuales fueron generadas por mutagénesis sitio-dirigida. La actividad específica de CAT de las fusiones que contienen las mutaciones fue determinada en EPEC B171-8 crecida en LB a 37°C y está representada como el porcentaje de la actividad específica de la fusión contenida en pCAT232. Los datos representan el promedio obtenido con al menos tres experimentos independientes.

aunque su regulación por factores ambientales fue proporcionalmente similar a la de la fusión silvestre (Figs. 8 y 9B).

Interesantemente, la mutación G-12T aumentó 30 veces la expresión basal de *bfpA-cat*, obtenida en ausencia de BfpT (Fig. 9B). Experimentos de "primer extension", mostraron que la transcripción inicia en la misma posición tanto en la cepa silvestre de EPEC como en la mutante en *bfpT* (Fig. 10B, carriles 3 y 4), el cual es el mismo inicio de la transcripción del gen *bfpA* y de la fusión *bfpA-cat* silvestre (Fig. 10A y 10B, carril 1), descartando la posibilidad de que se hubiera generado un promotor alternativo con la mutación G-12T.

Anteriormente habíamos reportado que la transcripción de *bfpA* iniciaba en una G (Puente et al., 1996); sin embargo, en este trabajo se demuestra que la transcripción inicia en una A, una base corriente abajo de la G (Fig. 10A). El punto de inicio de la transcripción que se determinó en este trabajo está localizado 7 pb corriente abajo de la región promotora -10, la cual se considera como una distancia consenso para promotores de *E. coli* (Harley y Reynolds, 1987). Estos resultados mostraron que las secuencias que se habían propuesto para las regiones -10 y -35, componen realmente el promotor de *bfpA*.

Un cambio de G por T en la posición -29 (G-29T, una base corriente abajo de la secuencia -35), aumentó dos veces la expresión de *bfpA-cat* en todas las condiciones de crecimiento que se probaron (Fig. 9B). Esta mutación también produjo un aumento de 9.8 veces en el nivel basal de expresión obtenido en ausencia de BfpT, sin alterar el inicio de la transcripción (Fig. 9B y Fig. 10, carril 2). Como se describió anteriormente, un efecto similar se produjo por la mutación G-12T, sugiriendo que la mutación G-29T generó un promotor más fuerte. Esto es consistente con el hecho de que una T es la base que se encuentra más frecuentemente una posición corriente abajo de la secuencia consenso -35 en *E. coli* (Harley y Reynolds, 1987).

Mutaciones que disminuyen la expresión de *bfpA* (mutaciones negativas). Seis diferentes fusiones *bfpA-cat* con mutaciones fuera del promotor que disminuyeron su expresión, se obtuvieron y caracterizaron. Tres de estas fusiones tuvieron una remoción de una sola base (pMG51, pMG58 y pMG65) y una tuvo una inserción de

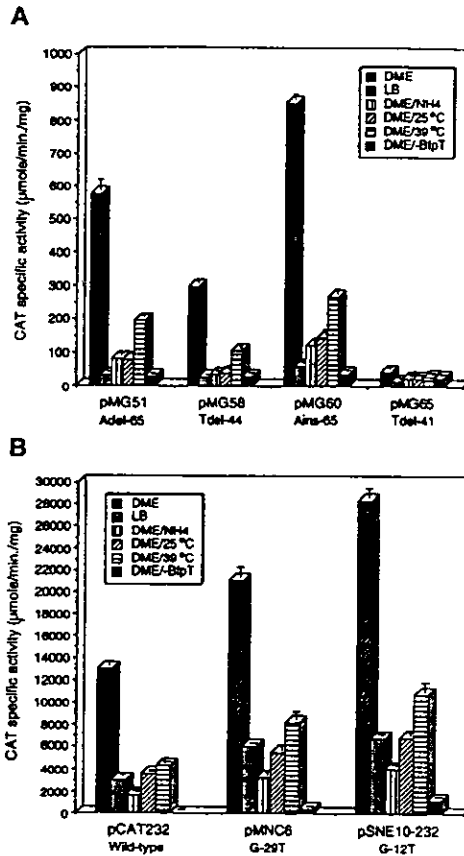


Fig. 9. Regulación de algunas de las fusiones *bfpA-cat* que contienen mutaciones en su región reguladora. La actividad específica de CAT de las fusiones que contienen mutaciones que disminuyen su expresión (pMG51, pMG58, pMG60 y pMG65) (A) o mutaciones en el promotor (pMNC6 y pSNE10-232) (B), fue determinada en EPEC B171-8 crecida en LB a 37°C, 25°C y 39°C; o en LB a 37°C; o en DME que contiene 15 mM de sulfato de amonio, a 37°C; o en EPEC T::Gmr, en DME a 37°C. La gráfica muestra la actividad específica máxima de CAT alcanzada durante el cultivo. Los datos representan el promedio y la desviación estándar obtenidos con al menos tres experimentos independientes.

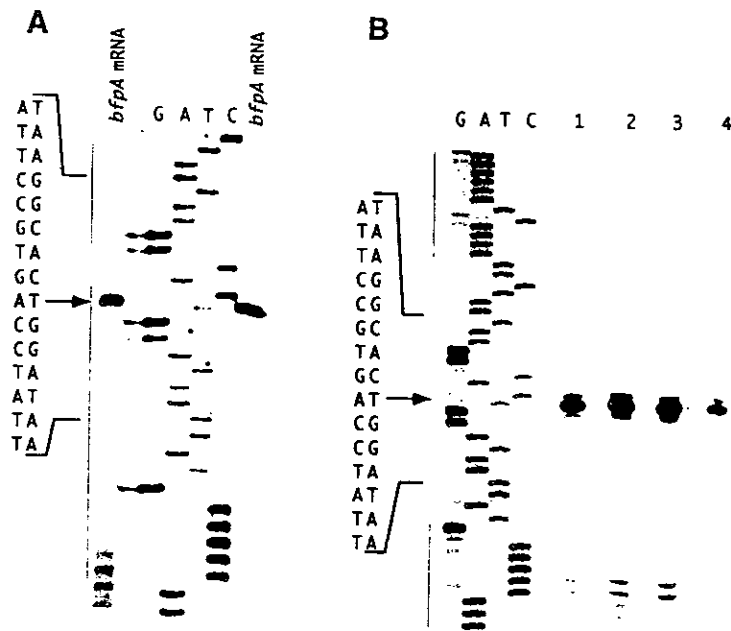


Fig. 10. Determinación del inicio de la transcripción del gen *bfpA* y de algunas de las fusiones *bfpA-cat* por "primer extension". (A) El RNA total obtenido de EPEC B171-8, se hibridó con un oligonucleótido complementario al extremo 5' del gen *bfpA*; la reacción de "primer extension" se realizó con transcriptasa reversa AMV, como se describe en Materiales y Métodos. Los carriles marcados como G, A, T y C corresponden a la secuencia obtenida con el mismo oligonucleótido. El producto de la transcripción de *bfpA* se muestra a la izquierda y a la derecha de la secuencia. La flecha indica la posición del inicio de la transcripción, la cual corresponde a una A que está marcada en negrilla. (B) El RNA total obtenido de EPEC B171-8 que contiene los plásmidos pCAT232 (carril 1), pMNC6 (carril 2), pSNE10-232 (carril 3); o de la cepa de EPEC T::Gmr que contiene el plásmido pSNE10-232 (carril 4), se hibridó con un oligonucleótido complementario al extremo 5' del gen *cat*.

una base (pMG60), en diferentes posiciones de la región donde se localizan las secuencias repetidas invertidas IRS1 e IRS2 (Fig. 8). Las otras dos fusiones tuvieron una de las remociones mencionadas anteriormente, más un cambio de nucleótido en la posición -81 (pMNC54) o -15 (pMNC55); sin embargo, estos cambios adicionales no afectaron en mayor medida la actividad de *bfpA-cat* (Fig. 8). La remoción o inserción de una A en el trecho de 10 A's, localizado entre las posiciones -65 a -74, redujo la expresión de *bfpA-cat* al 1 y 2%, respectivamente; mientras que la remoción de una T en el trecho de 8 T's, localizado entre las posiciones -44 a -51, y la remoción de una de las dos T's de las posiciones -41 y -42, redujeron la expresión de la fusión a menos del 1% (Fig. 8). Interesantemente, el bajo nivel de expresión que mostraron las fusiones que contenían mutaciones negativas todavía requirió la presencia de BfpT y además se reguló por temperatura, amonio y medio de crecimiento (Fig. 9A).

Mutaciones que aumentan la expresión de *bfpA* (mutaciones positivas). Seis distintas fusiones *bfpA-cat*, con mutaciones fuera del promotor que incrementan ligeramente su expresión, se obtuvieron y caracterizaron. Dos de estas fusiones tuvieron un solo cambio de A por G en las posiciones -65 ó -66 (pMG1 y pMG3), las cuales son las primeras dos A's de la secuencia repetida IRS1 (Fig. 8). Las otras seis fusiones tuvieron una de estas mutaciones más un cambio adicional que no parece afectar la expresión, ya que su efecto fue similar al mostrado por las mutaciones únicas (Fig. 8). Así, el ligero incremento (1.3 veces) en la expresión mostrado por todas estas fusiones fue producido por los cambios A-65G y A-66G (Fig. 8). En particular, estas mutaciones podrían aumentar ligeramente la interacción de BfpT con la región reguladora de *bfpA*.

c)- La expresión independiente de BfpT de la fusión *bfpA-cat* que contiene la mutación que mejora el promotor (G-12T), es aún regulada por LB pero no por amonio.

Como se describió anteriormente, la mutación que mejora el promotor, contenida en pSNE10-232 (G-12T), produce un aumento de 30 veces en la expresión

de *bfpA-cat* en ausencia de BfpT (Figs. 9B y 11), sin alterar el punto de inicio de la transcripción (Fig. 10B, carril 4). Nosotros decidimos estudiar la regulación de esta actividad en las cepas de EPEC T::Gmr y B171-10, una cepa derivada de B171-8 que no contiene el plásmido pEAF. De manera interesante, la expresión independiente de BfpT se reprimió aún por LB pero no por amonio (Fig. 11). Este resultado nos llevó a analizar el papel de la secuencia comprendida entre las posiciones -85 y -46 en esta regulación independiente de BfpT. Para ésto, usando la misma estrategia que se describió anteriormente, se realizó un recorte del extremo 5' en la región reguladora de la fusión *bfpA-cat* contenida en pSNE10-232 hasta la posición -40, generando el plásmido pSNE10-40. Este plásmido se transformó en las cepas de EPEC T::Gmr y B171-10, y su expresión se analizó en cultivos crecidos en DME, LB o DME más amonio a 37°C. El recorte hasta la posición -40 no afectó la regulación de *bfpA* independiente de BfpT por LB (Fig. 11).

Estos resultados sugieren que el mecanismo molecular por medio del cual se reprime la expresión de *bfpA* por LB y amonio, es diferente. Para la represión por LB no se requiere de BfpT ni de la secuencia corriente arriba de la posición -40; en cambio, para la represión por amonio se requieren ambos elementos.

d)- Las regiones reguladoras de *bfpA* y *bfpT* presentan una región con alta identidad entre ellas.

Recientemente, en nuestro laboratorio se determinó que la expresión de *bfpT* se auto-activa y también se reprime por temperatura, amonio y medio de crecimiento (Martínez-Laguna et al., 1997). Considerando esto, nosotros esperamos que hubiera elementos en común, como por ejemplo la secuencia que reconoce BfpT, en las regiones reguladoras de *bfpA* y *bfpT*. El alineamiento de la secuencia de nucleótidos de estas regiones reveló la presencia de una secuencia, entre las posiciones -65 a -26 de la región reguladora mínima de *bfpT*, que tiene 73% de identidad con la región localizada entre las posiciones -85 a -46, la cual es necesaria para la expresión de *bfpA* dependiente de BfpT (Fig. 12). En contraste, no se encontró homología significativa con la región reguladora de *bfpA* corriente arriba de la posición -84 o

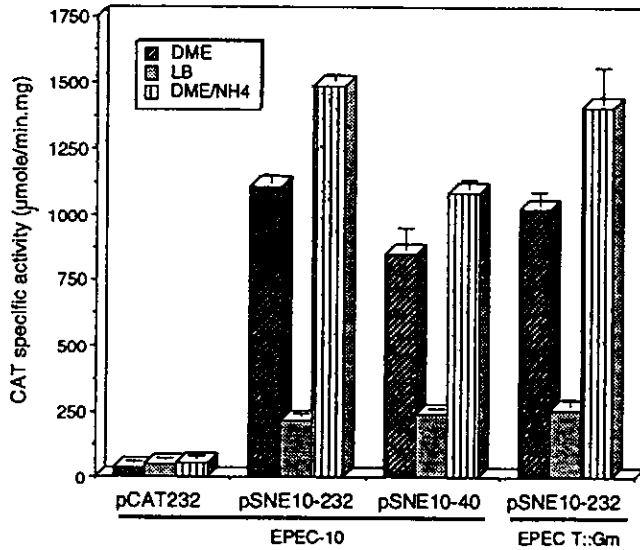


Fig. 11. Regulación en ausencia de BfpT de la fusión *bfpA-cat* que contiene la mutación en el promotor G-12T y de su derivada a la cual se le recortó la región reguladora hasta la posición -40. La actividad específica de CAT de la fusión que contiene la mutación en el promotor G-12T (pSNE10-232) y de su derivada a la cual se le recortó su extremo 5' hasta la posición -40 (pSNE10-40), fue determinada en EPEC B171-10, cepa derivada de B171-8 que no contiene el plásmido pEAF, o en EPEC T::Gm, crecidas en DME o LB a 37°C, o en DME que contiene 15 mM de sulfato de amonio a 37°C. Para efecto de comparación, la expresión de la fusión silvestre (pCAT232) en EPEC B171-10 está también graficada. La gráfica muestra la actividad específica máxima de CAT alcanzada durante el cultivo. Los datos representan el promedio y la desviación estándar obtenidos con al menos tres experimentos independientes.

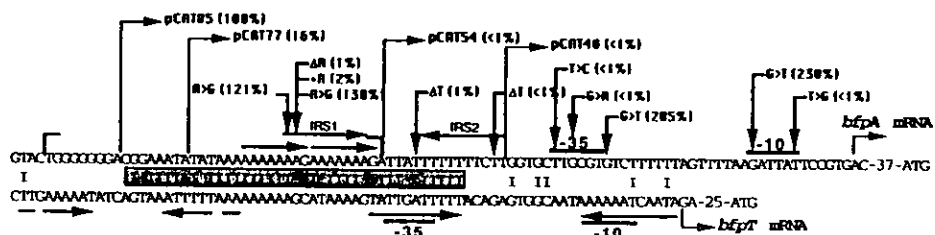


Fig. 12. Alineamiento de las regiones reguladoras de *bfpA* (secuencia de arriba) y *bfpT* (secuencia de abajo). La región reguladora corriente abajo de la posición -85 contiene todos los elementos requeridos para la regulación de *bfpA*, dependiente de BfpT (este estudio). La secuencia de *bfpA* localizada entre las posiciones -85 a -46 tiene 73% de identidad con una región de 40 pb (marcada con una barra sombreada), localizada entre las posiciones -65 a -26 de la región reguladora de *bfpT*, la cual es requerida para la auto-activación de *bfpT* (Martínez-Laguna et al., 1997). Los corchetes encierran la secuencia del fragmento de DNA que se unió a una fusión T7-tag-BfpT inmovilizada en esferas magnéticas (Tobe et al., 1996; Apéndice I). La posición de los recortes o mutaciones que afectaron la expresión de *bfpA-cat*, se indica con flechas. La actividad de CAT mostrada en paréntesis está expresada como porcentaje de la actividad de la fusión silvestre (pCAT232), a la cual se le asignó un valor de 100%. Flechas horizontales arriba o abajo de la secuencia muestran las secuencias repetidas invertidas o directas. Las secuencias -10 y -35 de los promotores y los inicios de la transcripción se encuentran también indicados.

corriente abajo de la posición -46 (Fig. 12).

Determinación de secuencias que inducen doblamientos en el DNA en la región reguladora de *bfpA*.

En varios estudios se ha reportado que la curvatura intrínseca del DNA, mediada en muchos casos por la presencia de trechos de cuatro o más A's colocados en fase, puede tener influencia en la expresión de ciertos promotores (Koo et al., 1986; Pérez-Martín et al., 1994). Como se describió anteriormente, en el presente estudio se encontró que la secuencia rica en A-T, localizada entre las posiciones -85 a -54, es necesaria para la expresión de *bfpA*. Así, un método basado en PCR se usó para predecir si la secuencia de esta región podría inducir doblamientos en el DNA (Valle F., 1994).

Ocho fragmentos de 200 pb, que abarcan la región reguladora de *bfpA* de las posiciones -374 a +146 se obtuvieron por PCR (Fig. 13A) y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% a 40°C (Fig. 13B). En este tipo de ensayos, el retardamiento en la movilidad de los fragmentos de DNA es indicativo de la presencia de un doblamiento y es mayor cuando éste se encuentra en el centro de los fragmentos. La migración de cuatro fragmentos se retardó claramente, indicando la presencia de secuencias que producen doblamiento en ellos (Fig. 13B). La movilidad relativa de cada fragmento se graficó contra la posición de su centro, con respecto al inicio de la transcripción (Fig. 13C). Esta gráfica mostró que la secuencia que induce doblamiento está localizada entre los nucleótidos de las posiciones -125 a -100, una región claramente corriente arriba de la secuencia requerida para la expresión de *bfpA*.

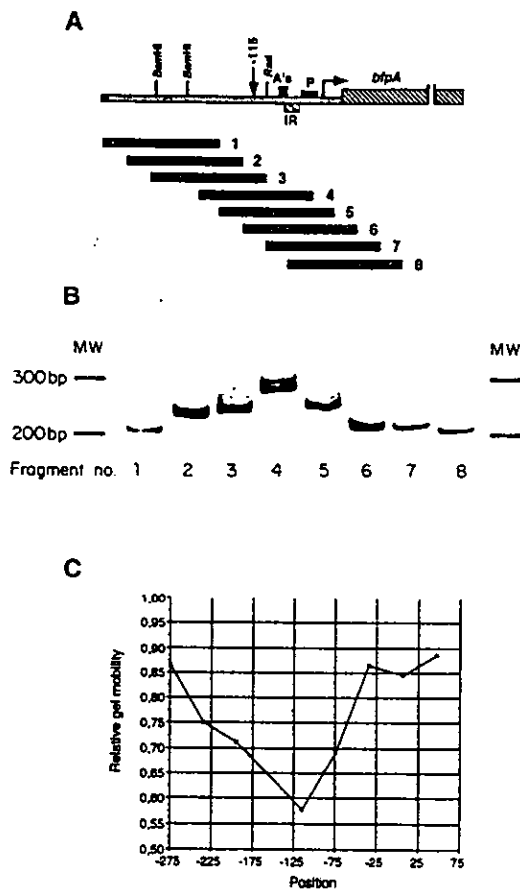


Fig. 13. Determinación de secuencias que inducen doblamientos en la región reguladora de *bfpA*. Un método basado en PCR fue usado para la determinación de secuencias que inducen doblamientos (ver Materiales y Métodos). **(A)** Representación esquemática de los fragmentos de 200 pb, obtenidos por PCR, los cuales cubren la región reguladora de *bfpA*. Fragmento 1, posiciones -374 a -175; fragmento 2, posiciones -334 a -135; fragmento 3, posiciones -294 a -95; fragmento 4, posiciones -214 a -15; fragmento 5, posiciones -174 a +26; fragmento 6, posiciones -134 a +66; fragmento 7, posiciones -94 a +106 y fragmento 8, posiciones -54 a +106. La flecha indica el centro de doblamiento deducido de la gráfica del panel C. **(B)** Separación por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% de los fragmentos que se muestran en el panel A. Los marcadores de peso molecular se indican como MW. **(C)** Determinación del centro de doblamiento. La movilidad relativa de cada fragmento se graficó contra la posición del centro de cada fragmento, con respecto al inicio de la transcripción de *bfpA*.

DISCUSION

La expresión del operón *bfp*, el cual es necesario para la producción del pili BFP y el fenotipo de adherencia localizada por EPEC, está bajo el control de la región reguladora de *bfpA*, el gen que codifica para la subunidad estructural de BFP (Sohel et al., 1993; 1996; Ramer et al., 1996). La expresión de *bfpA* es modulada a nivel transcripcional por la temperatura, la concentración de amonio y el medio de crecimiento (Puente et al., 1996).

Nuestras primeras observaciones indicaron que la máxima eficiencia de transcripción de *bfpA* requería de los tres genes del locus *bfpTVW*, localizado 6.7 kb corriente abajo del operón *bfp*, en el plásmido EAF (Tobe et al., 1996; Apéndice I). En este trabajo se demuestra que el producto de *bfpT* (BfpT), un miembro de la familia de reguladores transcripcionales AraC, es el único que se necesita para activar la transcripción de *bfpA*, tanto en una cepa de *E. coli* no enteropatógena, como en la cepa de EPEC mutada en *bfpT*, la cual se usó en el primer estudio (Figs. 3 y 4). Asimismo, contrario a lo observado inicialmente, el gen *bfpV* parece tener un papel de modulador negativo, ya que en ausencia de este gen se incrementa la expresión de *bfpA* dependiente de BfpT (Figs. 3 y 4).

La discrepancia entre los resultados obtenidos en este trabajo y los encontrados inicialmente, se explican en parte por la constante aparición de ciertas mutaciones que inactivan a *bfpT*. Por ejemplo, una inserción de una G en un trecho de 7 G's, localizado entre los codones 36 a 38 de *bfpT*, produce un cambio de fase en este gen. Algunos de los plásmidos utilizados en el primer estudio (plásmidos que contienen *bfpT* o *bfpT* y *bfpV*) probablemente contenían esta mutación y debido a esto produjeron resultados diferentes.

El probable papel de modulador negativo de *bfpV* está siendo investigado con más detalle en nuestro laboratorio. En experimentos recientes se ha observado que la ausencia de *bfpV* causa un incremento de cuando menos 10 veces en el nivel de RNAm de *bfpT* (Sánchez-SanMartín et al., datos no publicados). Así, el aumento en la expresión de *bfpA*, producido por la ausencia de *bfpV*, podría deberse a un

incremento en la expresión de BfpT. Diferentes experimentos se están llevando a cabo para determinar si la ausencia de *bfpV* incrementa la expresión y/o la estabilidad del RNAm de *bfpT*; así como, para determinar si *bfpV* codifica para una proteína o si su secuencia es un elemento regulador que actúa en *cis*.

Nosotros estamos interesados en definir el mecanismo molecular que regula la expresión de *bfpA*. La caracterización de la secuencia de DNA que reconoce BfpT podría ayudar a entender mejor su mecanismo de acción. Sin embargo, la interacción de BfpT con sus sitios de unión ha sido difícil de estudiar *in vitro*, ya que no se ha logrado sobre-expresar y purificar a esta proteína. Aun bajo el control de promotores fuertes y fusionado a diferentes proteínas o péptidos, no se ha detectado la expresión de BfpT en geles de poliacrilamida (Fig. 5, tabla 2); sin embargo, estas fusiones son capaces de inducir la expresión de *bfpA* en trans, indicando que dirigen la síntesis de una proteína activa (Figs. 3 y 4).

En *E. coli*, la sobre-expresión de proteínas suele dificultarse cuando los genes contienen codones que se usan con baja frecuencia en esta bacteria (Pedersen, 1984; Kane, 1995). Un análisis del uso de codones en *bfpT* reveló un alto contenido de codones (mayor al 20%) que se usan poco en *E. coli*, principalmente los codones AGG, AGA y ATA, que son los menos utilizados por esta bacteria. Aunque estos codones se encuentran distribuidos a lo largo de la secuencia de *bfpT*, en algunas regiones se agrupan consecutivamente, situación que se ha postulado afecta en mayor grado la traducción de genes en *E. coli* (Chen y Inouye, 1990; Kane, 1995). Así, la presencia y distribución de codones que utiliza *E. coli* con poca frecuencia, podría ser una de las principales razones que limita la sobre-expresión de BfpT, aun bajo el control de promotores fuertes. Aunado a esto, el RNAm o la proteína podrían ser particularmente inestables. Otra de las probables razones que impiden la sobre-expresión de BfpT, es la constante aparición de mutaciones que inactivan su gen, las cuales se mencionaron anteriormente. En su conjunto, estos mecanismos podrían de manera natural controlar la cantidad de BfpT en la célula, la cual en mayor cantidad pudiera ser tóxica.

Actualmente, en nuestro laboratorio se está estudiando cómo se regula a nivel traduccional la síntesis de BfpT, por medio de fusiones traduccionales al gen *lacZ*. Asimismo, se tiene contemplado expresar *bfpT* en presencia de los genes que codifican para los tRNA's de los codones de baja frecuencia en *E. coli*, o bien, expresarlo en bacterias u otros organismos con diferente uso de codones.

Debido a lo anterior, una ruta alternativa para identificar el sitio de unión de BfpT, así como otras secuencias requeridas para la expresión de *bfpA*, fue analizar genéticamente su región reguladora.

El análisis de recortes a partir del extremo 5' de la región reguladora de *bfpA-cat*, mostró que una fusión recortada hasta la posición -85 (pCAT85) expresa niveles similares a la de otras fusiones que contienen más secuencia corriente arriba, además de que mantiene el mismo patrón de regulación en respuesta a señales ambientales y a la presencia de BfpT. En cambio, la expresión de una fusión recortada hasta la posición -77 (pCAT77) se disminuyó 84%, aunque aún respondió a las señales reguladoras en las mismas proporciones que la fusión silvestre (pCAT232). En contraste, se detectaron únicamente niveles basales de expresión para las fusiones con recortes a las posiciones -54 o -40 (pCAT54 o pCAT40), las cuales contienen aún intacto el promotor (Figs. 6 y 7). Estos resultados indicaron que la secuencia requerida para la regulación de *bfpA*, dependiente de BfpT, está comprendida entre las posiciones -85 a -54 y que la secuencia CGGAAATA entre las posiciones -85 y -77, contiene nucleótidos necesarios para su activación.

La región de *bfpA* entre las posiciones -85 a -54 contiene una secuencia repetida directa de 8 pb (AAAAAAG), así como la mitad de una secuencia repetida invertida de 10 pb (IRS1) (AAGAAAAAA) (Fig. 6). El papel de estos elementos en la expresión de *bfpA* no es claro ya que no son suficientes para una activación completa, como lo muestra el bajo nivel de expresión obtenido con la fusión *bfpA-cat* recortada a la posición -77 (pCAT77), la cual contiene a ambos elementos intactos (Figs. 6 y 7). Sin embargo, se ha reportado que otros miembros de la familia AraC/XylS, como AraC, MelR y VirF, reconocen secuencias repetidas invertidas o directas (Lobell y Schleif, 1990; Caswell et al., 1992; Wattiau y Cornelis, 1994).

Por ejemplo, AraC, el prototipo de esta familia de reguladores, regula a nivel transcripcional el operón *araBAD*, actuando positivamente en presencia de arabinosa y negativamente en su ausencia. En presencia de arabinosa, un dímero de AraC se une a una secuencia repetida directa compuesta de los sitios *araI*₁ y *araI*₂, resultando en la activación del operón *araBAD* (Lee et al., 1987; Lobell y Schleif, 1990). En ausencia de arabinosa, el dímero de AraC se une a la secuencia repetida directa compuesta de los sitios *araI*₁ y *araO*₂; este último localizado 210 pb corriente arriba de *araI*₁, formando una estructura que reprime la expresión de *araBAD* (Dunn et al., 1984; Lobell y Schleif, 1990). En contraste, ExsA, también miembro de la familia AraC/XylS, reconoce una secuencia consenso definida (TXAAAAXA), localizada corriente arriba de la posición -52, con respecto al inicio de transcripción (Hovey y Frank, 1995).

Para otros miembros de la familia AraC/XylS que regulan genes de virulencia, no se ha estudiado en detalle la secuencia que reconocen, debido principalmente a que no se han logrado purificar; sin embargo, se han identificado algunas características comunes. Rns, CfaD, VirF y ToxT requieren de una secuencia rica en A/T, localizada corriente arriba de la región -35, para activar los genes que regulan (Jost y Alder, 1993; Tobe et al., 1993; Jordi et al., 1994; Brown y Taylor, 1995; Murphree et al., 1997). Otra característica en común de estos reguladores, excepto ToxT, es que parecen contrarrestar la regulación negativa, asociada a temperaturas por debajo de los 37°C, ejercida por H-NS sobre los promotores que reconocen, un mecanismo que podría también reprimir la expresión de *bfpA* a estas temperaturas.

Para caracterizar con detalle la secuencia que controla la expresión de *bfpA*, se generaron mutaciones al azar en su región reguladora. Los resultados obtenidos revelaron que remociones de una sola base o una inserción de una sola base en la secuencia corriente arriba del promotor, pero corriente abajo de la posición -85 (la inserción o remoción de una A en el trecho de 10 A's, localizado entre las posiciones -65 a -74; la remoción de una T en el trecho de 8 T's, localizado entre las posiciones -44 a -51, o la remoción de una de las dos T's, localizadas en las posiciones -41 y -42, ver Fig. 6), disminuyeron la expresión de *bfpA-cat* a menos del 2% (Fig. 8). De

manera interesante, este reducido nivel de expresión requirió aún de la presencia de BfpT y fue regulado por temperatura, concentración de amonio y medio de cultivo (Fig. 9). En contraste a lo observado con las remociones o la inserción de una base en el trecho de 10 A's, dos cambios en la misma región, A por G en las posiciones -65 ó -66, causaron un ligero incremento en la expresión de *bfpA-cat* (Fig. 8).

Estos resultados sugieren que la expresión eficiente de *bfpA* requiere de la estructuración y organización precisa de los elementos en *cis* que la controlan. Así, el fenotipo negativo producido por la inserción y las remociones de una base, podría deberse a una distorsión en la estructura del DNA, lo cual produciría un cambio ligero, pero significativo, en la orientación del sitio de unión de BfpT con respecto al promotor, alterando su interacción con otras moléculas, como la RNA polimerasa. La orientación apropiada de los sitios de unión con respecto al promotor es necesaria para la activación transcripcional por CRP, OmpR y FNR, entre otros activadores (Maeda et al., 1988; Gaston et al., 1990; Ushida y Aiba, 1990; Wing et al., 1995). Para el caso de FNR, la remoción o inserción de una sola base entre su sitio de unión y el promotor, disminuye drásticamente la activación dependiente de este regulador en un promotor semisintético (Wing et al., 1995).

En intentos por identificar mutaciones que suprimieran el efecto de la inserción o remociones contenidas en las fusiones *bfpA-cat* de los plásmidos pMG60 (Ains-65), pMG51 (Adel-65), pMG58 (Tdel-44) y pMG65 (Tdel-41), se han encontrado únicamente revertantes, apoyando la idea de que la región reguladora de *bfpA* mantiene una estructura fina que es necesaria para su activación por BfpT.

La secuencia -10 del promotor propuesto para *bfpA* (GATTAT) muestra características típicas de los promotores controlados positivamente, como la ausencia de una T en la primera posición y la presencia de una A y una T en las posiciones dos y seis, respectivamente, con respecto a la secuencia consenso de los promotores de *E. coli*, dependientes de sigma-70 (TATAAT) (Raibaud y Schwartz, 1984). A este respecto, el fenotipo producido por dos mutaciones confirmaron la función de esta secuencia. El cambio de T por G (T-7G) en la posición seis, apagó completamente la expresión de la fusión *bfpA-cat* contenida en el plásmido pSAW10; mientras que el

cambio de G por T (G-12T) en la primera posición, aumento más de dos veces la expresión de la fusión contenida en el plásmido pSNE10-232, en todas las condiciones de crecimiento probadas (Figs. 8 y 9). De manera interesante, la mutación G-12T aumentó 30 veces el nivel de fondo de la expresión de *bfpA-cat*, obtenido en ausencia de BfpT (Fig. 9), lo cual sugiere que las diferencias entre la secuencia de la región -10 de *bfpA* y la secuencia -10 consenso de *E. coli*, determinan que la expresión de *bfpA* dependa del activador BfpT.

La secuencia -35 del promotor propuesto para *bfpA* (TTGCGT) contiene las bases más conservadas del consenso (TTGACA), que son las tres primeras posiciones. La importancia de estas bases fue revelada por el análisis de la actividad de fusiones *bfpA-cat*, que contienen dos tipos de mutaciones. El cambio de T por C (T-35C) o de G por A (G-33A), en la primera y tercera posición, respectivamente, disminuyeron la expresión de la fusión al nivel del fondo (Fig. 8), sugiriendo que la secuencia -35 se requiere para la expresión de *bfpA*, en contraste con lo observado para la mayoría de los promotores controlados positivamente (Raibaud y Schwartz, 1984).

La estrategia que se siguió para introducir y seleccionar mutaciones al azar en la región reguladora de *bfpA* no generó todas las mutaciones posibles, como aquéllas que se generaron por mutagénesis sitio-dirigida o mutaciones en la región localizada entre las posiciones -85 a -77, la cual se demostró que es importante para la activación. A este respecto, la estrategia que se utilizó favoreció algunos cambios, como lo muestra el hecho que las mismas mutaciones se obtuvieron en las cuatro condiciones de PCR usadas y que la mayoría de los cambios fueron transiciones de bases (purina por purina o pirimidina por pirimidina). Por otra parte, también cabe la posibilidad de que el efecto de otras mutaciones puntuales no sea lo suficientemente grande para ser detectado por el método de selección usado, como lo fue para la inserción o remociones de una base, lo cual permitió su fácil y recurrente aislamiento.

La expresión independiente de BfpT mostrada por la fusión que contiene la mutación en el promotor G-12T (pSNE10-232) se reprimió aún por LB, pero no por amonio. Además, un recorte de esta fusión hasta la posición -40 (pSNE10-40) no

afectó su expresión independiente de BfpT, ni su regulación por LB (Fig. 11). Estos resultados sugieren que la represión de *bfpA*, en respuesta al crecimiento en LB y a la concentración de amonio, está mediada por dos mecanismos diferentes. Para la represión por LB no se requiere de BfpT ni de la secuencia corriente arriba de la posición -40, en cambio, para la represión por amonio se requieren ambos elementos.

En un estudio anterior se propuso que los niveles de expresión en LB y DME podrían depender, al menos parcialmente, de qué tanto dure la fase exponencial; ya que *bfpA* se expresa únicamente durante la fase exponencial de crecimiento y que para EPEC esta fase dura 3 horas en LB y 7 horas en DME (Puente et al., 1996). Así, la represión por LB podría estar mediada por un mecanismo general de *E. coli*, el cual reprime la expresión de promotores dependientes de σ -70 en la fase estacionaria de crecimiento. A este respecto, para algunos genes de *E. coli* que se expresan únicamente en fase exponencial, se ha demostrado que RpoS está involucrado en su represión en fase estacionaria. En estos casos se ha propuesto que RpoS podría inducir la expresión de un represor en fase estacionaria, competir por la RNA polimerasa "core", o bien, actuar directamente como un represor (Xu y Johnson, 1995). Algo similar podría ocurrir para la represión de *bfpA* en fase estacionaria.

En el caso de la regulación por amonio, resultados obtenidos recientemente sugieren la existencia de un factor específico en EPEC, el cual podría inducirse por amonio o detectar su presencia para reprimir la expresión de *bfpA*, ya sea uniéndose a su región reguladora o modificando a BfpT (Martínez-Laguna et al., en preparación).

En nuestro laboratorio se ha encontrado que la expresión de *bfpT* se autoactiva y también se regula por temperatura, concentración de amonio y medio de crecimiento (Martínez-Laguna et al., 1997). En apoyo a nuestros resultados, un alineamiento entre las regiones reguladoras de *bfpA* y *bfpT* reveló la presencia, como parte de la región mínima reguladora de *bfpT*, de una secuencia que tiene 73% de identidad con la secuencia localizada entre las posiciones -85 a -46, región requerida para la expresión de *bfpA* dependiente de BfpT (Fig. 12). En contraste, no se encontró homología significativa con la región de *bfpA* corriente arriba de la posición -84 o

corriente abajo de la posición -46. Además, tampoco se encontró homología entre las regiones reguladoras de *bfpA* y *eaeA*, el gen que codifica para la intimina de EPEC y el cual se mostró que es regulado por el producto de *bfpW* (*perC*) y no por BfpT (*PerA*) (Gómez-Duarte y Kaper, 1995).

De manera interesante, esta región homóloga en *bfpA* está localizada 20 pb (dos vueltas completas del DNA) corriente arriba de la posición donde se encuentra en *bfpT*, sugiriendo que BfpT puede activar la transcripción colocado en diferentes posiciones, siempre y cuando se mantenga la orientación apropiada de sus sitios de unión con respecto al promotor. A este respecto, muchas proteínas reguladoras de *E. coli*, entre ellas SoxS y MarA, miembros de la familia AraC/XylS, son capaces de activar la transcripción desde diferentes posiciones con respecto al promotor (Collado-Vides et al., 1991; Jair et al., 1995; 1996).

Finalmente, el análisis de secuencias que inducen doblamientos, mostró que la secuencia corriente abajo de la posición -85 no presenta curvatura intrínseca (Fig. 13). Por el contrario, se localizó una secuencia que induce doblamiento entre las posiciones -125 a -100, corriente arriba de la secuencia que se requiere para la expresión de *bfpA* (Fig. 13), la cual, alternativamente, podría jugar un papel en la expresión de *rsvA*, un gen localizado corriente arriba de *bfpA*, el cual se transcribe de forma divergente (Puente et al., 1996; Soheli et al., 1996). Aunque la secuencia rica en A-T, localizada entre la posición -85 y el promotor, no presenta curvatura intrínseca, es probable que la unión de BfpT genere un doblamiento, el cual permita estabilizar la interacción con la secuencia que reconoce o favorezca interacciones con la RNA polimerasa. A este respecto, se ha sugerido que MelR y MarA, miembros de la familia AraC/XylS, inducen doblamientos en el DNA cuando se unen a las regiones reguladoras del operón *melAB* o *marRAB*, respectivamente (Martin et al., 1996; Bourgerie et al., 1997).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se demostró que BfpT es el único producto del locus *bfpTVW* que activa la expresión de *bfpA* y que los elementos en *cis* que se requieren para la regulación de *bfpA*, dependiente de BfpT, tales como el sitio de unión de este activador, están localizados en la región comprendida entre las posiciones -85 a -46.

Los nucleótidos específicos que reconoce BfpT, en la región localizada entre las posiciones -85 a -46, podrán ser caracterizados por mutagénesis sitio-dirigida y/o por ensayos de interacción proteína/DNA *in vivo*. Asimismo, la introducción por mutagénesis sitio-dirigida de secuencias que contengan la mitad o vueltas completas de DNA, entre esta región y el promotor, ayudará a investigar la hipótesis de que BfpT puede activar la transcripción colocado en diferentes posiciones, siempre y cuando se mantenga la orientación apropiada de sus sitios de unión con respecto al promotor.

Los resultados obtenidos sugieren que *bfpV* participa como modulador negativo de la expresión de *bfpA*, dependiente de BfpT. Diferentes experimentos se están llevando a cabo para determinar si la ausencia de *bfpV* incrementa la expresión y/o la estabilidad del RNAm de *bfpT*; así como, para determinar si *bfpV* codifica para una proteína o si su secuencia es un elemento regulador que actúa en *cis*.

En este trabajo también se caracterizó el promotor de *bfpA* y se encontró que la que la represión de este gen, en respuesta al crecimiento en LB y a la concentración de amonio, está mediada por dos mecanismos diferentes. Para la represión por LB no se requiere de BfpT ni de la secuencia corriente arriba de la posición -40, en cambio, para la represión por amonio se requieren ambos elementos.

Actualmente, en nuestro laboratorio se están generando mutantes de EPEC, mediante una mutagénesis con transposones, para la identificación de los factores involucrados en la represión de *bfpA*, en respuesta al crecimiento en LB, la concentración de amonio y la temperatura. Asimismo, se están construyendo mutantes de EPEC en reguladores globales, como RpoS y HNS, para determinar su papel en la regulación de este gen.

BIBLIOGRAFIA

- Ali, S. A., and A. Steinkasserer. 1995. PCR-ligation-PCR mutagenesis: a protocol for creating gene fusions and mutations. *BioTechniques* 18:746-750.
- Allaoui, A., P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1993. MxiD, an outer membrane protein necessary for the secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins. *Mol. Microbiol.* 7:59-68.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Barrios, H., H.-M. Fischer, H. Hennecke, and E. Morett. 1995. Overlapping promoters for two different RNA polymerase holoenzymes control *Bradyrhizobium japonicum nifA* expression. *J. Bacteriol.* 177:1760-1765.
- Bourgerie, S. J., C. M. Michan, M. S. Thomas, S. J. Busby, and E. I. Hyde. 1997. DNA binding and DNA bending by the MelR transcription activator protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 25:1685-1693.
- Boyer, H. W., and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41:459-472.
- Brosius, J. 1984. Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene* 27:151-160.
- Brown, R. C., and R. K. Taylor. 1995. Organization of *tcp*, *acf*, and *toxT* genes within a ToxT-dependent operon. *Mol. Microbiol.* 16:425-39.
- Bujard, H., R. Gentz, M. Lanzer, D. Stuber, M. Muller, I. Ibrahimi, M. T. Hauptle, and B. Dobberstein. 1987. A T5 promoter based transcription-translation system for the analysis of proteins in vivo and in vitro. *Methods in Enzymology* 155:416-433.
- Caron, J., L. M. Coffield, and J. R. Scott. 1989. A plasmid-encoded regulatory gene, *rns*, required for expression of the CS1 and CS2 adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:963-967.
- Caswell, R., C. Webster, and S. Busby. 1992. Studies on the binding of the *Escherichia coli* MelR transcription activator protein to operator sequences at the *melAB* promoter. *Biochem. J.* 287:501-508.

- Chen, G. T., and M. Inouye. 1990. Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression: preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes. *Nucleic Acids Res.* **18**:1465-1473.
- Collado-Vides, J., B. Magasanik and J.D. Gralla. 1991. Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **55**:371-394.
- Cornelis, G., C. Sluifers, C. Lambert de Rouvroit, and T. Michiels. 1989. Homology between VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon, and AraC, the *Escherichia coli* arabinose operon regulator. *J. Bacteriol.* **171**:254-262.
- Cravioto, A., R. Gross, S. Scotland, and B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* **3**:95-99.
- Cravioto, A., A. Tello, A. Navarro, J. Ruíz, H. Villafán, F. Uribe, and C. Eslava. 1991. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet* **337**:262-264.
- de Haan, L. A. M., G. A. Willshaw, B. A. M., van der Zeijst, and W. Gaastra. 1991. The nucleotide sequence of a regulatory gene present on a plasmid in an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain of serotype O167:H5. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**:341-346.
- Donnenberg, M. S., J. A. Girón, J. P. Nataro, and J. B. Kaper. 1992. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol. Microbiol.* **6**:3427-3437.
- Donnenberg, M. S., J. B. Kaper, and B. B. Finlay. 1997. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol.* **5**:109-114.
- Dunn, T. M., S. Hahn, S. Ogden, and R. F. Schleif. 1984. An operator at -280 base pairs that is required for expression of *araBAD* operon promoter: addition of DNA helical turns between the operator and promoter cyclically hinders repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:5017-5020.
- Echeverría, P., F. Orskov, I. Orskov, S. Knutton, F. Scheutz, J. E. Brown, and U. Lexomboon. 1991. Attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* as a cause of infantile diarrhea in Bangkok. *J. Infect. Dis.* **164**:550-554.
- Edwards, R. A., and D. M. Schifferli. 1997. Differential regulation of *fasA* and *fasH* expression of *Escherichia coli* 987P fimbriae by environmental cues. *Mol. Microbiol.* **25**:797-809.

- Edwards, R. A., and J. L. Puente. 1998. Fimbrial regulation: A critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol.* 6:(en prensa).
- Elliott, S. J., L. A. Wainwright, T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, Y. K. Deng, L-Ch. Lai, B. P. McNamara, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* 28:1-4
- Foubister, V., I. Rosenshine, and B. B. Finlay. 1994(a). A diarrheal pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), triggers a flux of inositol phosphates in infected epithelial cells. *J. Exp. Med.* 179:993-998.
- Foubister, V., I. Rosenshine, M. S. Donnenberg, and B. B. Finlay. 1994(b). The *eaeB* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* is necessary for signal transduction in epithelial cells. *Infect. Immun.* 62:3038-3040.
- Frank, D. W., B. H. Iglewski. 1991. Cloning and sequence analysis of a *trans*-regulatory locus required for exoenzyme S synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 173:6460-6468.
- Gallegos, M-T., R. Schleif, A. Bairoch, K. Hofmann, and J. L. Ramos. 1997. AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:393-410.
- Gaston, K., A. Bell, A. Kolb, H. Buc, and S. Busby. 1990. Stringent spacing requirements for transcription activation by CRP. *Cell* 62:733-743.
- Girón, J.A., A. S. Y. Ho, and G. K. Schoolnik. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* 254:710-713.
- Girón, J.A., A. S. Y. Ho, and G. K. Schoolnik. 1993. Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:7391-7401.
- Gómez-Duarte, O. G., and J. B. Kaper. 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63:1767-1776.
- Gómes, T. A., P. A. Blake, and L. R. Trabulsi. 1989. Prevalence of *Escherichia coli* strains with localized, diffuse, and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. *J. Clin. Microbiol.* 27:266-269.
- Gottesman, S., E. Halpern, and P. Trisler. 1981. Role of *sulA* and *sulB* in filamentation by Lon mutants of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* 148:265-273.

- Harley, C. B., and R. P. Reynolds.** 1987. Analysis of *E. coli* promoters. *Nucl. Acids Res.* **15**:2343-2361.
- Higgins, D. E., E. Nazareno, and V. J. Dirita.** 1992. The virulence gene activator ToxT from *Vibrio cholerae* is a member of the AraC family of transcriptional activators. *J. Bacteriol.* **174**:6974-6980.
- Hobbs, M., and J. S. Mattick.** 1993. Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Mol. Microbiol.* **10**:233-243.
- Hovey, A. K., and D. W. Frank.** 1995. Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J. Bacteriol.* **177**:4427-4436.
- Jair, K.-W., R. G. Martin, J. L. Rosner, N. Fujita, A. Ishihama, and R. E. Wolf, Jr.** 1995. Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of *Escherichia coli* multiple antibiotic and superoxide resistance promoters. *J. Bacteriol.* **177**:7100-7104.
- Jair, K.-W., W. P. Fawcett, N. Fujita, A. Ishihama, and R. E. Wolf, Jr.** 1996. Ambidextrous transcriptional activation by SoxS: requirement for the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit in a subset of *Escherichia coli* superoxide-inducible genes. *Mol. Microbiol.* **19**:307-317.
- Jarvis, K. G., J. A. Giron, A. E. Jerse, T. K. McDaniel, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper.** 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:7996-8000.
- Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall, and J. B. Kaper.** 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:7839-7843.
- Jerse, A.E., and J. B. Kaper.** 1991. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect. Immun.* **59**:4302-4309.
- Jordi, B. J., B. A. van der Zeijst, and W. Gastra.** 1994. Regions of the CFA/I promoter involved in the activation by the transcriptional activator CfaD and repression by the histone-like protein H-NS. *Biochimie.* **76**:1052-1054.

- Jost, B. H. and B. Adler. 1993. Site of transcriptional activation of *virB* on the large plasmid of *Shigella flexneri* 2a by VirF, a member of the AraC family of transcriptional activators. *Microbial Pathogenesis*. 14:481-488.
- Kane, J. F. 1995. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Op. Biotech*. 6:494-500.
- Kaniga, K., J. C. Bossio, and J. E. Galán. 1994. The *Salmonella typhimurium* invasion genes *invF* and *invG* encode homologues of the AraC and *puID* family of proteins. *Mol. Microbiol*. 13:555-568.
- Kaper, J. B. 1998. EPEC delivers the goods. *Trends Microbiol*. 6:169-173.
- Kato, J. I., K. I. Ito, A. Nakamura, and H. Watanabe. 1989. Cloning of regions required for contact hemolysis and entry into LLC-MK2 cells from *Shigella sonnei* form I plasmid: *virF* is a positive regulator gene for these phenotypes. *Infect. Immun*. 57:1391-1398.
- Kenny, B., and B. B. Finlay. 1995. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:7991-7995.
- Kenny, B., L. C. Lai, B. B. Finlay, and M. S. Donnenberg. 1996. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol. Microbiol*. 20:313-323.
- Kenny, B., and B. B. Finlay. 1997. Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1. *Infect. Immun*. 65:2528-2536.
- Kenny, B., A. Abe, and B. B. Finlay. 1997(a). Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun*. 65:2606-2612.
- Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey, and B. B. Finlay. 1997(b). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91:511-520.
- Klaasen, P., and F. K. de Graaf. 1990. Characterization of FapR, a positive regulator of expression of the 987P operon in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*. 4:1779-1783.

- Knutton, S., M. Baldini, J. Kaper, and A. McNeish. 1987. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Infect. Immun.* 55:78-85.
- Koo, H.- S., H. M. Wu, and D. M. Crothers. 1986. DNA bending at adenine-thymine tracts. *Nature.* 308:509-513.
- Lai, L-C., L. A. Wainwright, K. D. Stone, and M. S. Donnenberg. 1997. A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. *J. Bacteriol.* 65:2211-2217.
- Lee, N., C. Francklyn, and E. Hamilton. 1987. Arabinose-induced binding of AraC protein to *araI*₂ activates the *araBAD* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8814-8818.
- Leung, D., E. Chen, and D. V. Goeddel. 1989. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* 1:11-15.
- Levine, M. M., J. P. Nataro, H. Karch, M. M. Baldini, J. B. Kaper, R. E. Black, M. L. Clements, and A. D. O'Brien. 1985. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J. Infect. Dis.* 152:550-559.
- Levine, M. M., and R. Edelman. 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol. Rev.* 6:31-51.
- Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155:377-385.
- Lobell, R. B., and R. F. Schleif. 1990. DNA looping and unlooping by AraC protein. *Science* 250:528-532.
- Maeda, S., Y. Ozawa, T. Mizuno, and S. Mizushima. 1988. Stereospecific positioning of the *cis*-acting sequence with respect to the canonical promoter is required for activation of the *ompC* gene by a positive regulator, OmpR, in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 202:433-441.
- Manjarrez-Hernández, H. A., T. J. Baldwin, A. Aitken, S. Knutton, and P. H. Williams. 1992. Intestinal epithelial cell protein phosphorylation in enteropathogenic *Escherichia coli* diarrhoea. *Lancet.* 339 :521-3.

- Martin, R. G., K.-W. Jair, R. E. Wolf, Jr., and J. L. Rosner. 1996. Autoactivation of the *marRAB* multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:2216-2223.
- Martínez-Laguna, Y., E. Calva, and J. L. Puente. 1997. Regulation of *bfpT*, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*, abstr. H-171, p. 313. *In* Abstracts of the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology 1997. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Mayer, M. P. 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene.* **163**:41-46.
- McConnell, M. M., H. Chart, S. M. Scotland, H. R. Smith, G. A. Willshaw, and B. Rowe. 1989. Properties of adherence factor plasmids of enteropathogenic *Escherichia coli* and the effect of host strain on expression of adherence to HEp-2 cells. *J. Gen. Microbiol.* **135**:1123-1134.
- McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:1664-1668.
- McDaniel, T. K., and J. B. Kaper. 1997. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K12. *Mol. Microbiol.* **23**:399-407.
- Murphree, D., B. Froehlich, and J. R. Scott. 1997. Transcriptional control of genes encoding CS1 pili: negative regulation by a silencer and positive regulation by Rns. *J. Bacteriol.* **179**:5736-5743.
- Nataro, J. P., K. Maher., P. Mackie, and J. Kaper. 1987. Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **55**:2370-2377.
- Nataro, J. P., D. Yikang, D. Yingkang, and K. Walker. 1994. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**:4691-4699.
- Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:142-201.
- Ogierman, M. A., and P. A. Manning. 1992. Homology of TcpN, a putative regulatory protein of *Vibrio cholerae*, to the AraC family of transcriptional activators. *Gene* **116**:93-97.

- Pedersen, S.** 1984. *Escherichia coli* ribosomes translate in vivo with variable rate. EMBO J. 3:2895-2898.
- Pérez-Martín, J., F. Rojo, and V. de Lorenzo.** 1994. Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression. Microbiol. Rev. 58:268-290.
- Puente, J. L., D. Bieber, S. W. Ramer, W. Murray, and G. K. Schoolnik.** 1996. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. Mol. Microbiol. 20:87-100.
- Raibaud, O., and M. Schwartz.** 1984. Positive control of transcription initiation in bacteria. Ann. Rev. Genet. 18:173-206.
- Ramer, S. W., D. Bieber, G. K. Schoolnik.** 1996. BfpB, an outer membrane lipoprotein required for the biogenesis of bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 178:6555-6563.
- Rosenshine I, M. S. Donnenberg, J. B. Kaper, and B. B. Finlay.** 1992. Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. EMBO J. 11:3551-3560.
- Rosenshine, I., S. Ruschkowski, M. Stein, D. J. Reinscheid, S. D. Mills, and B. B. Finlay.** 1996. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. EMBO J. 15:2613-2624.
- Rothbaum, R., A. McAdams, R. Giannella, and J. Partin.** 1982. A clinicopathologic study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. Gastroenterol. 83:441-454.
- Rothbaum, R., J. Partin, K. Saalfield, and A. McAdams.** 1983. An ultrastructural study of enteropathogenic *Escherichia coli* infection in humans infants. Ultrastruct. Pathol. 4:291-304.
- Sakai, T., C. Sasakawa, S. Makino, and M. Yoshikawa.** 1986. DNA sequence and product analysis of the *virF* locus responsible for Congo red binding and cell invasion in *Shigella flexneri* 2a. Infect. Immun. 54:395-402.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
- Savelkoul, P.H., G. A. Willshaw, M. M. McConnell, H. R. Smith, A. M. Hamers, B. A. Van-der-Zeijst, and W. Gaastra. 1990. Expression of CFA/I fimbriae is positively regulated. *Microb. Pathog.* **8**:91-9.
- Scaletsky, I. C. A., M. L. M. Silva, and L. R. Trabulsi. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.* **45**:534-536.
- Sohel, I., J. L. Puente, W. J. Murray, J. Vuopio-Varkila, and G. K. Schoolnik. 1993. Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes. *Mol. Microbiol.* **7**:563-575.
- Sohel, I., J. L. Puente, S. W. Ramer, D. Bieber, Ch.-Y. Wu, and G. K. Schoolnik. 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J. Bacteriol.* **178**:2613-2628.
- Stone, K. D., H.-Z. Zhang, L. K. Carlson, and M. S. Donnenberg. 1996. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol. Microbiol.* **20**:325-337.
- Strom, M. S., and S. Lory. 1993. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**:565-596.
- Tobe, T., M. Yoshikawa, T. Mizuno, and C. Sasakawa. 1993. Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* of *Shigella flexneri*: activation by *virF* and repression by H-NS. *J. Bacteriol.* **175**:6142-6149.
- Tobe, T., G. K. Schoolnik, I. Sohel, V. H. Bustamante, and J. L. Puente. 1996. Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**:963-975.
- Ushida, C., and H. Aiba. 1990. Helical phase dependent action of CRP: effect of the distance between the CRP site and the -35 region on promoter activity. *Nucleic Acids Res.* **18**:6325-6330.
- Valle, F. 1994. PCR-based method to map the bending locus of DNA molecules. *PCR Methods Appl.* **4**:44-45.

- Vuopio-Varkila, J., and G. K. Schoolnik.** 1991. Localized adherence by enteropathogenic *Escherichia coli* is an inducible phenotype associated with the expression of new outer membrane proteins. *J. Exp. Med.* **174**:1167-1177.
- Wang, R. F., and S. R. Kushner.** 1991. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene.* **100**:195-199.
- Wattiau, P., and G. R. Cornelis.** 1994. Identification of DNA sequences recognized by VirF, the transcriptional activator of the *Yersinia yop* regulon. *J. Bacteriol.* **176**:3878-3884.
- Wing, H. J., S. M. Williams, and S. J. W. Busby.** 1995. Spacing requirements for transcription activation by *E. coli* FNR protein. *J. Bacteriol.* **177**:6704-6710.
- Xu, J., and R. C. Johnson.** 1995. Identification of genes negatively regulated by Fis: Fis and RpoS comodulate growth-phase-dependent gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**:938-947.
- Zamenhof, P. J., and M. Villarejo.** 1972. Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting alpha-complementation of β -galactosidase fragments *in vivo*. *J. Bacteriol.* **110**:171-178.

ANEXOS

Apéndice I

Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*

Toru Tobe,^{1,3} Gary K. Schoolnik,^{1,2,3*} Indira Sohel,^{1,3} Victor H. Bustamante⁴ and Jose Luis Puente⁴

¹Department of Microbiology and Immunology, and

²Department of Medicine (Division of Infectious Diseases and Geographic Medicine), and ³The Howard Hughes Medical Institute, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305, USA.

⁴Department of Molecular Microbiology, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62271, México.

Summary

Expression of the bundle-forming pilus (BFP) of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is regulated at the transcriptional level by growth phase, temperature, calcium and ammonium. Genes required for the transcriptional activation of *bfpA* were localized to a 1.8 kb fragment of the enteroadherent factor (EAF) plasmid of EPEC that is separated from the *bfp* operon by 6 kb. Within this fragment three identically oriented and closely spaced open reading frames (ORFs) were identified and designated *bfpT*, *bfpV* and *bfpW*. *bfpT* is predicted to encode a 31.8 kDa protein that shares homology with the AraC family of transcriptional regulators, including the presence of a conserved C-terminal DNA-binding helix-turn-helix motif. Insertional inactivation of *bfpT* led to the loss of *bfpA* transcription, BfpA protein production and the localized adherence (LA) phenotype; this mutant phenotype could be complemented by introduction of *bfpTVW* and, on separate plasmids, *bfpT*+*bfpW*. However, introduction of *bfpT*+*bfpV*, *bfpV* alone, *bfpW* alone, or *bfpV*+*bfpW* did not enable recovery of the wild-type phenotype. Maximal efficiency of *bfpA* transcription required all three genes, but *bfpV* and *bfpW* each enhanced transcription providing *bfpT* was also present. A series of deletions of the *bfpA* upstream promoter region was prepared; with respect to the *bfpA* transcription start site, sequence between nucleotides -94 and -55 was found to bind

bfpT. BfpT also bound a DNA fragment containing the *eeeA* promoter region on the EPEC chromosome. From these results we conclude that *bfpTVW* causes transcriptional activation of *bfpA*, and possibly *eeeA*, by a *trans*-acting mechanism that may co-ordinately regulate the expression of EPEC virulence determinants.

Introduction

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a leading cause of diarrhoea among infants and children living in developing countries. Microscopic observations of EPEC-infected epithelial cell monolayer cultures have led to the idea that EPEC infection of the small bowel occurs in three stages. According to this model, the initial phase involves the long-range attachment of bacterial colonies to the epithelial cell surface. Subsequently, juxtaposition of the epithelial cell plasma membrane and bacteria' outer membrane ensues facilitating the transduction of signals to the host cytoplasm, which leads, during the final stage, to a profound rearrangement of the cytoskeleton (for a review, see Donnenberg and Kaper, 1992; Law, 1994).

This stepwise infection process can be studied experimentally by incubating EPEC with cultured epithelial cells, which leads to the formation of circumscribed colonies of bacteria attached to the cell surfaces. This pattern of attachment constitutes the 'localized adherence' phenotype (LA) and is now recognized to be a consistent property of the EPEC biotype (Cravioto *et al.*, 1979; Nataro *et al.*, 1985; 1987). *In vitro* studies of this kind have shown that the LA phenotype requires the production of bundle-forming pili (BFP) (Donnenberg *et al.*, 1992; S. Ramer, unpublished observation); BFP are thin flexible fibres that emanate from the bacterial surface where they coalesce as laterally aligned bundles of fibres (Giron *et al.*, 1991). Examination of EPEC colonies or epithelial cell surfaces by scanning electron microscopy suggests that these bundles physically stabilize colonies of EPEC by forming interbacterial linkages (Giron *et al.*, 1991; Sohel *et al.*, 1993). Sequence analysis of BfpA, the BFP subunit, shows that it belongs to the type IV family of pilus proteins (for a review, see Strom and Lory, 1993; and Hobbs and Mattick, 1993).

bfpA is located on the -80 kb EPEC adherent-factor

Received 1 February, 1996; revised 6 June, 1996; accepted 13 June, 1996. *For correspondence. E-mail ML.gks@Forsythe.Stanford.EDU; Tel. (415) 7238158; Fax (415) 7231399.

Table 1. *Escherichia coli* strains and plasmids

Strain/Plasmid	Description	Reference
Strain		
B171-8	EPEC O111.NM, containing the EAF plasmid	Puente <i>et al.</i> (1996)
B171-4	EAF-plasmid-minus derivative of B171-8	Riley <i>et al.</i> (1987)
T Gm ^R	<i>bfpT</i> ::Gm ^R mutant, derived from B171-8	This work
DH5 α	<i>E. coli</i> K-12 derivative laboratory strain	Hanahan (1983)
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> K-12 derivative carrying cloned T7 RNA polymerase gene	Studier and Moffat (1986)
Plasmid		
pKK232-8	pBR322 derivative containing a promoterless chloramphenicol acetyltransferase (<i>cat</i>) gene	Brosius (1984)
pWKS130	Low-copy-number cloning vector (Km ^R)	Wang and Kushner (1991)
pMW119Tp	Low-copy-number cloning vector (Tp ^R)	Durand <i>et al.</i> (1994)
pCAT642B	<i>bfpA</i> - <i>cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -642 to +36	Puente <i>et al.</i> (1996)
pBTA-BH1	pWKS130 derivative carrying the 3.9 kb <i>Bam</i> HI EAF fragment containing the <i>bfpT</i> locus	This work
pBTA-GL3	pWKS130 derivative carrying the 7.0 kb <i>Bgl</i> II EAF fragment containing the <i>bfpT</i> locus	This work
pSS9	pACYC177 derivative carrying the 4.0 kb <i>Hind</i> III EAF fragment containing <i>bfpA</i>	Sohel <i>et al.</i> (1993)
pACYC-VW	pACYC177 derivative carrying the 865 bp <i>Ssp</i> I- <i>Bgl</i> II EAF fragment containing <i>bfpV</i> and <i>bfpW</i>	This work
pACYC-W	pACYC177 derivative carrying the 493 bp <i>Nsp</i> I- <i>Bgl</i> II EAF fragment containing <i>bfpW</i>	This work
pTB101	Expression vector containing the <i>tac</i> promoter, <i>lacI</i> ^R	Tobe <i>et al.</i> (1992)
pTB101-T	pTB101 derivative, containing the promoterless <i>bfpT</i> gene	This work
pTB101-T1	pTB101 derivative, containing promoterless <i>bfpT</i> and <i>bfpV</i> genes	This work
pTB101-T2	pTB101 derivative, containing promoterless <i>bfpT</i> , <i>bfpV</i> and <i>bfpW</i> genes	This work

Km^R, kanamycin resistance; Tp^R, trimethoprim resistance; Gm^R, gentamicin resistance.

plasmid (EAF plasmid) (Sohel *et al.*, 1993; Donnenberg *et al.*, 1992). Production of *bfpA* mRNA commences during the exponential phase of growth in tissue-culture media and the amount of BFP protein produced is modulated at the transcriptional level by temperature and by the concentrations of calcium and ammonia in the growth medium (Puente *et al.*, 1996). We have proposed that induction of

bfpA expression also occurs in the proximal small bowel in response to these and perhaps other environmental signals (Puente *et al.*, 1996).

To monitor *bfpA* expression, we have employed a *bfpA*-*cat* transcriptional reporter system that was constructed by ligating a 678 bp sequence, located immediately upstream of the *bfpA* translation initiation codon, to the promoterless chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene contained in plasmid pKK232-8 (Brosius, 1984). When the resulting plasmid, pCAT642B (Puente *et al.*, 1996), is harboured in an EAF plasmid-positive wild-type EPEC strain (B171-8, Table 1), transcription of *bfpA* can be monitored by the production of CAT activity as a function of growth phase and environmental signals (Puente *et al.*, 1996). However, in *Escherichia coli* DH5 α , a non-EPEC host, which lacks the EAF plasmid, or in *E. coli* strain B171-4, an EPEC that has lost the EAF plasmid the *bfpA*-*cat* fusion on pCAT642B is transcriptionally silent. Thus, *bfpA* expression appears to require a separate EAF plasmid locus (Puente *et al.*, 1996).

In this study we have used this reporter system to screen EAF plasmid-DNA libraries for a fragment that induces the production of CAT activity by DH5 α /pCAT642B. Here, we report the cloning and characterization of *bfpT*, an EAF plasmid locus that contains genes required for the activation of *bfpA* transcription and which may mediate the environmental regulation of *bfpA* expression.

Results

Cloning of an EAF plasmid fragment that induces *bfpA* expression

Five separate EAF plasmid libraries were prepared using *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Hinc*II or *Sac*I fragments cloned into the low-copy-number vector pWKS130 (Table 1) pWKS130 confers kanamycin resistance and is compatible with pCAT642B, which confers resistance to ampicillin. Plasmid DNA pools of these libraries were introduced into DH5 α /pCAT642B by transformation and the resulting transformants plated onto Luria-Bertani (LB) agar containing 200 μ g ml⁻¹ ampicillin and 50 μ g ml⁻¹ kanamycin. After colonies simultaneously resistant to ampicillin and kanamycin grew for 4 h in DMEM containing 0.45% glucose, dilutions of these cultures were plated onto LE agar containing chloramphenicol (50 μ g ml⁻¹) in addition to ampicillin and kanamycin. Transformants containing pCAT642B will exhibit CAT-mediated resistance to chloramphenicol, providing they also harbour the EAF locus that activates *bfpA* expression. Several chloramphenicol-resistant colonies from the *Bam*HI, *Bgl*II and *Sac*I libraries were recovered from the plates and grown for plasmid isolation. Plasmid DNA from each colony was digested with *Bam*HI, *Bgl*II or *Sac*I and their restriction profiles

were compared. All the chloramphenicol-resistant colonies were found to contain, besides pCAT642B, a recombinant plasmid carrying a unique EAF plasmid fragment (for *Bam*HI a fragment of approx. 3.9 kb; for *Bgl*II a fragment of approx. 7.0 kb; and for *Sac*I a fragment of approx. 30 kb).

Each of these clones was tested for the production of CAT activity. DH5 α /pCAT642B+pBTA-BH1 (for the *Bam*HI library), DH5 α /pCAT642B+pBTA-GL3 (for the *Bgl*II library), and DH5 α /pCAT642B+pBTA-SC1 (for the *Sac*I library) were found to produce between 35-fold and 40-fold more CAT activity than DH5 α /pCAT642B, which contains the cloning vector pWKS130, or clones carrying other EAF plasmid fragments. Therefore, only those DH5 α strains carrying pCAT642B plus pBTA-BH1, pBTA-GL3 or pBTA-SC1 were able to express CAT activity in the absence of the intact EAF plasmid.

To further evaluate the role of the isolated clones in *bfpA* expression, plasmids pBTA-BH1 and pBTA-GL3 were introduced into two EAF-plasmid-negative strains (DH5 α or B171-4, Table 1) carrying the compatible plasmid pSS9, which contains a fragment of the EAF plasmid including *bfpA* and its upstream promoter sequence, but lacking the downstream 13 genes of the *bfp* operon, including the gene that encodes the prepilin peptidase *bfpP* (Zhang *et al.*, 1994; Sohel *et al.*, 1996). Although pSS9 is unable to express the BFP subunit in strains DH5 α and B171-4 (Sohel *et al.*, 1993), these hosts express abundant levels of BfpA prepilin when carrying pSS9 plus pBTA-BH1 or pBTA-GL3 (Fig. 1, A and B). We infer from these observations and mapping experiments (data not shown) that pBTA-BH1, pBTA-GL3 and

pBTA-SC1 carry overlapping EAF plasmid fragments which contain an EAF-plasmid locus that induces *bfpA* expression. Consequently, we have designated this locus '*bfpT*' because, as demonstrated below, it carries three genes (*bfpT*, *bfpV* and *bfpW*) that are involved in the transcriptional activation of *bfpA*.

Sequence analysis of the *bfpT* locus

Plasmid pBTA-BH1 was selected for sequence analysis because it contains the smallest insert by comparison with the other positive clones. The complete nucleotide sequence of the 3913 bp insert was determined and found to contain five open reading frames (ORFs). Three ORFs designated *bfpT*, *bfpV*, and *bfpW*, were localized to the *Bam*HI–*Bgl*II segment (from nucleotide 1 to 1821); these ORFs are predicted to be in the same orientation and to be separated by fewer than 50 bp (49 bp separates *bfpT* from *bfpV* and 47 bp separates *bfpV* from *bfpW*). These features and additional data described below suggest that the *bfpT* locus is probably a single operon containing three genes. The fourth ORF (ORF4) identified in the pBTA-BH1 insert corresponds to nucleotides 2805–2355 and is located 582 bp downstream of *bfpW* and in the opposite orientation. The fifth ORF (ORF5) corresponds to nucleotides 3337–3897 and is located 534 bp upstream of ORF4 in the same orientation as *bfpT*, *bfpV* and *bfpW*. The words described below focuses on the functions of *bfpTVW*.

bfpT extends from nucleotide 194 to 1018 and is predicted to encode a 31784 Da protein comprising 271 amino acids. A ribosome-binding site with the sequence GAAGG was identified 6 bp upstream of the putative translation initiation codon. Comparison of BfpT with translated sequences deposited in GenBank revealed significant homology to a number of bacterial transcriptional regulators belonging to the family of proteins represented by AraC, the regulator of the *E. coli* and *Salmonella typhimurium* arabinose operons (Gallegos *et al.*, 1993). The multiple alignment of these proteins is depicted in Fig. 2 and shows that BfpT, as for all members of the AraC family, is most homologous in the C-terminal third of the sequence. This region contains a helix-turn-helix motif that is believed to bind upstream regulatory sequences of genes whose expression is regulated by environmental signals (Fig. 2). The second ORF, designated *bfpV*, extends from nucleotide 1066 to 1455 and is predicted to encode a 14546 Da protein comprising 130 amino acids. The third ORF, designated *bfpW*, extends from nucleotide 1505 to 1774 and is predicted to encode a 10575 Da protein comprising 90 amino acids. Neither *bfpV* nor *bfpW* was found to be significantly homologous to any proteins in the GenBank database.

Just downstream of *bfpTVW* is a 343 bp segment corresponding to nucleotides 1793–2136 that exhibits significant

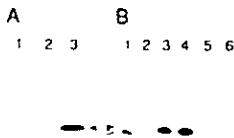


Fig. 1. Activation of *bfpA* expression by a plasmid containing the *bfpT* locus of the EAF-plasmid.

A. Western blot analysis using a BFP-specific antiserum, of DH5 α containing pSS9 (Sohel *et al.*, 1993) alone (lane 1), DH5 α containing pSS9 and the vector plasmid pWKS130 (lane 2) or DH5 α containing pSS9 and pBTA-BH1 (lane 3).

B. Western blot analysis of BfpA expression by B171-4 (lane 1); B171-4 containing pSS9 alone (lane 2); B171-4 containing pSS9 and pBTA-BH1 (lane 3); B171-4 containing pSS9 and pBTA-GL3 (lane 4); B171-4 containing pSS9 and pBTA-1D (lane 5); or B171-4 containing pSS9 and pBTA-9P (lane 6). B171-4 expresses the normal, signal peptidase-processed bundle-forming pilin (BFP) subunit (position indicated by an open triangle). The presence of pBTA-BH1 or pBTA-GL3 led to the expression of the unprocessed BFP subunit (closed triangles) by pSS9 which lacks the prepilin signal peptidase gene.

DNA homology with several insertion (IS)-like elements. These include the left-hand end of the insertion element IS630 (Matsutani *et al.*, 1987), the 5' end of a cryptic ORF encoded by the insertion element IS630 of *Shigella sonnei* (Matsutani *et al.*, 1987), the 3' untranslated region of the *InsABCDE* gene cluster required for Tn7 transposition (Flores *et al.*, 1990), the 3' untranslated region of *yopH*, which codes for a virulence determinant in *Yersinia*

pseudotuberculosis (Bolin and Wolf-Watz, 1988), the 3' end of the RepFIC replicon of the F plasmid where the region coding for a putative *repA1* gene is interrupted by the transposon Tn1000 (Saadi *et al.*, 1987), and the IS element located upstream of *astA*, the gene coding for heat-stable enterotoxin 1 (Savarino *et al.*, 1993) from enteroaggregative *E. coli* (EAggEC).

ORF4 is located downstream of this IS-like sequence

```

BfpT 26  ISYONVIFLFGMOPKLNKK-----TEYVPEISLFLAKNTHWDM-----IV-GIDNSNPKRIIID-DA-LIKLQI
VirFs 20  I-----IILAKRINIVSSGN-----TILDEGOTIAIENICAFEE-----I-KSDSINFEIISLD-RN-LDLSII
Cfad 22  I-----IIMVYSEE-----KILFFALVLDVGNVDFR-----IQKILSERVAFRLM-GD-MHNRGQ
Rns 22  I-----IIMVYSEE-----KIDCFGNLVLFLGVDGFR-----MOKOILSEKVAFRLM-GD-MHNRGQ
FapR 11  V-----EIVLNKGN-----QVDFPRMVAIFQWISFNIE-----TIRKDGVLVESEDMK-HE-LTFSK
AggR 22  I-----ITIDVYTK-----G-SNLYLNELIIEGIDGN-----LQKSTVNFIAIRLS-SD-TIIRK
EnvY 14  LTEKE-----LQVSVNTHAFTLPK-----NYLAAFACINLVI-ELS--T-----LNHVLIH--INRNI-IND-YLPLK
ToxT 26  LIINDYKFWIDSGIAKLIDKN-----CLVSYLQSSSIIIDKKN-----AIQRFSLTSDENINYSVITISDS-FRSE
VirFy 34  I-----ISWONS-----QTYLDLEGMLFLRGC-----SVAVRCCTKEPCCQI-WIF
AppY 11  FICQS-----FDLIINRVR-DFKK-----NSL--LQVADKIRRELQ--VC-----PFLRIVD--IDKTKLCS--PFDVW
UreR 18  FYIENPHIAIVYGAKGEE-ING-----QITVYVNLTLIIPKYSQVSCDQNFPPYVIELHTLVSETELOS-VFSL
RhaR 44  FASDQQAIVADRYPODVEAETHDFGQVIVWRGNLHVLNDFYVYTRGDOLFYIHADDKHSFASVNDLV-----L
AraC 36  FI--DRPLGKMG-YILN-----LTI--RGQGVVKNOCDFVCRPGDILLFPPGELHRRRHPARE-----WYH

```

```

BfpT 96  SI-----SSDDSCYVKKIPTA-NEMOILVSN-----ITDIKYSGNKKKTEFI
VirFs 82  RIMEPIYSF-----QHSYSEKRLNKKPELL-SEEEVSLIFL-----KEM--PFGKRRKYSVACQ
Cfad 86  NAMIIYGM-----KVDINDRCRMSRKMTT-EVNKTLIELKLN-----NSH--D-DSAFESSLIY
Rns 86  DAMIIYGM-----KIDTNACRMSRKMTT-EVNKTLIELKLN-----NSH--D-NSAFESSLIY
FapR 74  RVIEPSVKF-----AAESYTNKRSFKERFKV-KSCSIVIDFRL-----KDNQSPFEETA-EYDPAI
AggR 86  DAMIIYGM-----KYDACSCPMSKQIIVA-DADDSVDFIIF-----DHN--D-DSRITSQIY
EnvY 74  KNCVVKFM-----NLL--ATPVIACHSTPEVPI-AMHSKQOP-----SRPCEAELTRAFVYDN
ToxT 97  SYTLGLMI-----NVLISEN-----PILLNCEHNDIAVLSV-----VNGFR-EINYSDEFIKVFF
VirFy 75  L-----PGSELSTFLHRFG-LSEIRRDNATPPELLVDFPILSQSIOMLCAIFERSD--PFSVLTQLRNEV
AppY 68  NEPCKGFTL-----DKN--GYTAEELPPLSLVSEFPEGIKIADSHS-----LW--LKEKFTISIAM
UreR 92  PLIKSGAP I-----7RRLPDIYHLSPEVVKINLQDQGLHEGT-----PSQETLFMOOSFTPLAV
RhaR 117  NIICYPERLKLN--LDWOGAI-PGFNASAGOP-----HWRLGSMGMAQARVIGQLHEHSSOHVFNEMAELEFGQAVY
AraC 95  QWVYFPRAYHREMLNW-----PSFIANTG-----FVLPDEAHQHPFSDLFQGIINAGCGEGRYSSELLAINTECL

```

```

BfpT 145  SFDDYNDKVVVLSASAKS-----IVDVIKVEIATSKNKLQSSSMFVSLVLELDNKL-----NLTKKILKPKK
VirFs 138  SAVSDEEALYTRVLSLS-----SLLAKIKVKNKPKRLESDNNLNLSAVNKRLESK-----KLTFEIDLRNH
Cfad 141  IEDVNNKELTEVLSSEF-----SDNVRNVEGLSMDLILDAFNVSEITPKRLESTNTISQOILMOLRNS
Rns 141  IEDVNNKELTEVLSSEF-----SDNVRNVEGLSMDLILDAFNVSEITPKRLESTNTISQOILMOLRNS
FapR 131  VVTFNPSFAIEVFAVVT-----SDITVLLFEDLTAQSLDAEMHISPEVVKRLESCLAQOILDMOLRNS
AggR 141  IEDVNNKELTEVLSSEF-----SADHVRNTEVQLSKRVAIADFNVSSEITPKRLESTNTISQOILMOLRNS
EnvY 130  FLQSRFTALLHYDRLSRD-----TVG-----SDQHYNARIVISLSPKPKKLVN-----MTESSVTECRNK
ToxT 150  SGFSPKVKKKYVETDLDL-----AMGSECLVSDIIVAWADGEGKINRMILQGLS-----SAPRELINSTL
VirFy 145  AFSSOGALFLSA-----LRHLGNRPEDLQKFMENYLOCAKSKFVAGLTKLELGVYVPRAWISERL
AppY 121  FKEGVVNS--FQ--TNINT-----EIKTGIEFNRVRAHDTPELLYVSEIKRKLND-----NYSVILNVR
UreR 152  THEGVDIILNREFNYDEPKNQ--A--THLLTQDQVQVLELNTLYTTSILRMLK-----LKEKFTISIAM
RhaR 188  NRRHYTSDSLPPTSSSETLLDK--LITLAAASLKPF-----ALDKFCLASCEPVLQDFROOTPATIQVNOVAV
AraC 162  RRRVAINESLPHPHDRNLEACQYEDHLA-----DGNF-----DIASVNDHVCLVSHLFOOLSEVLSWRD

```

```

BfpT 220  RRLATTDKLDRCLVLEKLVVVEINPKY
VirFs 213  RRLNSQSNDVRLKLVNEVYK
Cfad 216  RRLNSQENKNNKLVNPKYVYV
Rns 216  RRLNSQENKNNKLVNPKYVYV
FapR 206  RRLKPIIRSDHGNLSLVYVSPKVFEGVYV
AggR 216  RRLNSQDNKLVNPKYVYV
EnvY 201  RRLNSQMDNKLKLVNPKYVYV
ToxT 224  YSIVKHTGEPVQVYVSTVYVSTHNY
VirFy 220  RRLNSQNGKMLVLEKLVVVEINPKY
AppY 191  RRLKITSNLSNVLQKQVYVYV
UreR 223  RRLNSQTFSLVYVNRGKLVNPKYVYV
RhaR 262  RRLNSQHSRLLSIVTEGSDSIVYVYV
AraC 234  RRLNSQSTRVQATVGRNVDQVYVYV

```


and is predicted to encode a 150 amino acid protein. Comparison of this sequence with the GenBank database showed that it is homologous with the N-terminal half of three putative bacterial transposases: 44% identical with the protein product of the *Rhizobium meliloti* insertion sequence ISAm3 (Wheatcroft and Laberge, 1991); 35% identical with a protein specified by a region of the large plasmid that carries the epsilon-toxin gene of *Clostridium perfringens* (Hunter *et al.*, 1992); and 28% identical with a protein coded by the insertion sequence IS256 from the *Staphylococcus aureus* transposon Tn4001 (Byrne *et al.*, 1989) OFR5 is predicted to encode a 186 amino acid protein that shows no significant homology to any proteins in the GenBank database.

Construction and characterization of a bfpT mutant

To elucidate further the role of *bfpT* in the expression of *bfpA*, a *bfpT* mutant was constructed by replacing the wild-type *bfpT* gene on the EAF plasmid with *bfpT::Gm^R*, a mutation in which the gentamicin-resistant gene (*Gm^R*) has been inserted within the *bfpT* structural gene as described in the *Experimental procedures*. The restriction patterns of the wild type and mutated EAF plasmids were compared and found to differ only with respect to fragments containing *bfpT* (data not shown). Further characterization of the *bfpT::Gm^R* mutant showed that the mutation is associated with greatly reduced production of *bfpA* mRNA and protein and loss of the LA phenotype (Fig. 3). Provision of pBTA-GL3, which contains the wild-type *bfpT* locus, to the *bfpT::Gm^R* mutant fully restored *bfpA* mRNA and protein production and the LA phenotype. Therefore, either *bfpT* itself, or *bfpT* together with other genes within the *bfpT* locus, are required for the expression of *bfpA* and for the LA phenotype.

DNA sequence necessary to rescue the *bfpT::Gm^R* mutation

To determine the minimal DNA region within the *bfpT*

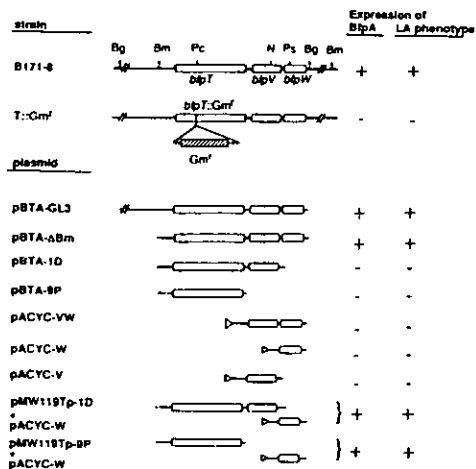


Fig. 3. Complementation test for the *bfpT* *Gm^R* mutation. Production of the BfpA protein was monitored by Western blotting using antiserum against bundle-forming pili (BFP), and expression of the localized adherence (LA) phenotype was determined using cultivated HEP-2 cells (+) denotes that the level of expression was the same as the wild-type EPEC strain B171-8 (-) indicates that the expression was greatly reduced or undetectable. The upper line depicts the physical map of the *bfp* locus including the location of restriction sites (Bg, *Bgl*II; Bm, *Bam*HI; Pc, *Pac*I; N, *Nsp*I; Ps, *Pst*I). The horizontal line for each plasmid corresponds to the fragment of the *bfpT* locus that was cloned to construct the plasmid. Triangles indicate the presence of the promoter of the *bfpA* gene on pACYC177.

locus that could complement the *bfpT::Gm^R* mutation we constructed a series of compatible plasmids, which carry all possible combinations of *bfpT*, *bfpV* and *bfpW* and introduced them into the *bfpT::Gm^R* mutant. Complementation was monitored by BfpA protein production and expression of the LA phenotype (Fig. 3). Using this experimental system we found the following: (i) expression of both phenotypes was restored by introducing the *Bam*HI-*Bgl*II 1.8 kb fragment (pBTA-ΔBm) which contains complete copies of each of these genes; (ii) by contrast, DNA

Fig. 2. Multialignment of BfpT with 12 other members of the AraC family of transcriptional regulators. Only part of the alignment is shown; the number at the left of the sequence corresponds to the most N-terminal amino acid of each protein for each of the compared segments. The two open boxes shown below the alignment are the DNA-binding domain and an additional helix-turn-helix motif found in the AraC family (Gallegos *et al.*, 1993). The boxed and shaded amino acids denote regions in which over five of the 13 compared sequences had identical amino acids. The sequences were aligned through the use of the multialignment CLUSTAL V program (Higgins, 1994). The compared sequences are: VirF5, involved in the regulation of virulence genes in *Shigella* (Sakai *et al.*, 1986); CiaD, required for the expression of CFA I fimbriae in enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) (Savelkoul *et al.*, 1990); Ans, required for the expression of the CS1 and CS2 adhesins of ETEC (Caron *et al.*, 1989); FapR, regulates expression of the 987P pilus operon in ETEC (Klaassen and de Graaf, 1990); AggR, is involved in the transcriptional activation of the aggregative adherence fimbria I of enteroaggregative *E. coli* (EAaggEC) (Nataro *et al.*, 1994); EnvY, is involved in the temperature-dependent expression of several *E. coli* envelope proteins (Lundrigan *et al.*, 1989); ToxT/TcpN, regulates the expression of virulence genes in *Vibrio cholerae* and is associated with the toxin co-regulated pilus (Tcp) gene cluster (Higgins *et al.*, 1992; Ogierman and Manning, 1992); VirF_Y, regulates expression of the virulence regulon in *Yersinia enterocolitica* (Cornelis *et al.*, 1989); AppY, regulates growth-phase-dependent expression of the acid phosphatase gene in *E. coli* (Allung *et al.*, 1989); UreR, regulates the expression of the urease operon (D'Orazio and Collins, 1993); RhaR, regulates expression of the rhamnose operon in *E. coli* (Tocin and Schiefel, 1987) and *AraC*, is involved in the regulation of genes required for L-arabinose utilization in *E. coli* and other enterobacteria (Wallace *et al.*, 1980; Stoner and Schiefel, 1982).

fragments containing *bfpT* but lacking *bfpW* (pBTA-1D) or lacking both *bfpV* and *bfpW* (pBTA-9P) could not complement the *bfpT::Gm^r* mutation; (iii) similarly, introduction of plasmids carrying only *bfpV* or *bfpW* or both *bfpV* and *bfpW*, placed downstream of the *bla* promoter on the plasmid vector pACYC177 (pACYC-V or pACYC-W or pACYC-VW), did not complement the mutant phenotype; (iv) however, introduction of all three genes on two separate compatible plasmids fully complemented the mutant, resulting in recovery of both BfpA protein production and the LA phenotype (Fig. 3, pMW119Tp-1D plus pACYC-W or pMW119Tp-9P plus pACYC-VW); (v) finally, introduction of the plasmid pACYC-W (*bfpW* alone) together with plasmid pMW119Tp-9P (*bfpT* alone) to the *bfpT::Gm^r* mutant resulted in recovery of both phenotypes. Taken together, these results suggest that insertion of the *Gm^r* cassette into *bfpT* disrupted the expression not only of *bfpT*, but also of the downstream genes, *bfpV* and *bfpW*. Moreover, these results also suggest that at least two of the three genes, *bfpT* and *bfpW*, are required for BfpA production and expression of the LA phenotype. Finally, because *bfpT* and *bfpW* were introduced on separate plasmids, it seems likely that both act *in trans* to induce *bfpA* expression.

To further explore these results, a separate series of experiments was conducted using B171-4/pSS9; B171-4 is an EAF-plasmid-negative derivative of B171-8 which harbours pSS9, a plasmid that contains the intact *bfpA* gene (Table 1). In the absence of the *bfpT* locus, B171-4/pSS9 does not produce *bfpA* mRNA or protein. However, provision of plasmid pBTA-ΔBm, which contains the 1.8 kb *Bam*HI–*Bgl*II fragment within which *bfpT*, *bfpV* and *bfpW* reside, led to the production of the preprocessed form of *bfpA*. By contrast, introduction of plasmids lacking the DNA segments containing *bfpW* (pBTA-1D) or *bfpV* and *bfpW* (pBTA-9P) did not activate *bfpA* gene expression on pSS9 (Fig. 1B). Therefore, the same results were obtained from the complementation experiments with the *bfpT::Gm^r* mutation on the EAF plasmid and from experiments using the B171-4/pSS9 construct.

Role of *bfpV* and *bfpW* in the transcriptional activation of *bfpA*

The studies described above indicate that production of the BfpA protein requires *bfpT* plus *bfpW*. To further investigate the role of *bfpT*, *bfpV* and *bfpW* in the transcription of *bfpA*, the efficiency of the transcriptional activation of *bfpA* was monitored using the EAF-plasmid-negative strain B171-4/pSS9 plus one of three plasmids for which the transcriptional output of *bfpT*, *bfpTV* or *bfpTVW* could be experimentally varied as a function of the IPTG concentration in the medium. These three plasmids are: (i) pTB101-T which carries *bfpT* under the control of the

tac promoter (i.e. a *P_{tac}-bfpT* fusion); or (ii) pTB101-T1, which carries the *P_{tac}-bfpT-bfpV* fusion; or (iii) pTB101-T2, which carries the *P_{tac}-bfpT-bfpV-bfpW* fusion. For each of these plasmids, the transcriptional activities of the corresponding *tac* transcriptional fusions were varied systematically by changing the IPTG concentration. The *bfpT* and *bfpA* mRNAs for each of the tested IPTG concentrations were quantitatively assayed by slot-blot hybridization and densitometry. In this way, the ratio of *bfpT* mRNA to *bfpA* mRNA was used as a measure of the efficiency by which *bfpT* locus products could activate *bfpA* transcription. As shown in Fig. 4A, the level of *bfpT* transcription varies directly as a function of the concentration of IPTG in the media. Nonetheless, in B171-4/pSS9 harbouring pTB101-T, *bfpA* transcription was enhanced only 10% even when *bfpT* transcription was induced 11.5-fold above the basal level. By contrast, for B171-4/pSS9 harbouring either pTB101-T1 or pTB101-T2, *bfpA* transcription increased proportionately with increases of *bfpT* transcription. However, as clearly shown in Fig. 4B, the most efficient activation of *bfpA* transcription was seen in B171-4/pSS9 carrying all three genes of the *bfpT* locus i.e. transcription of *bfpA* was more efficiently activated in B171-4/pSS9 carrying *bfpT*, *V* and *W* than in B171-4/pSS9 carrying only *bfpT* and *bfpV*. Taken together, these results indicate that the efficiency of *bfpA* transcriptional activation relative to *bfpT* transcription is greatest in the presence of three genes, that both *bfpV* and *bfpW* contribute to transcriptional activation when combined with *bfpT*; and that *bfpV* is probably involved in the activation of *bfpA* transcription as well as *bfpT* and *bfpW*.

Binding of the BfpT protein to *bfpA* promoter DNA and *eaeA* promoter DNA

The observation that BfpT shares homology with members of the AraC family of transcriptional activators suggested to us that the BfpT protein might bind upstream sequence in the *bfpA* promoter region. To test this possibility, we prepared a T7-tagged BfpT fusion protein and examined its ability to bind to *bfpA* promoter DNA. A T7-tagged fusion protein corresponding to *bfpT* was constructed and purified using anti-T7-tag antibody. For this purpose, DNA fragments of the *bfpT* structural gene without the translation initiation codon were inserted into pET21c in frame with the T7-tag peptide-coding sequence. The fusion protein was then expressed in strain BL21 (DE3) grown in LB broth containing IPTG, and the production of immunoreactive protein of the expected size demonstrated by Western blotting using the anti-T7-tag monoclonal antibody (data not shown). Furthermore, the fusion protein was shown to retain its expected capacity to activate *bfpA* transcription when expressed in strain BL21 (DE3) carrying pSS9 (data not shown).

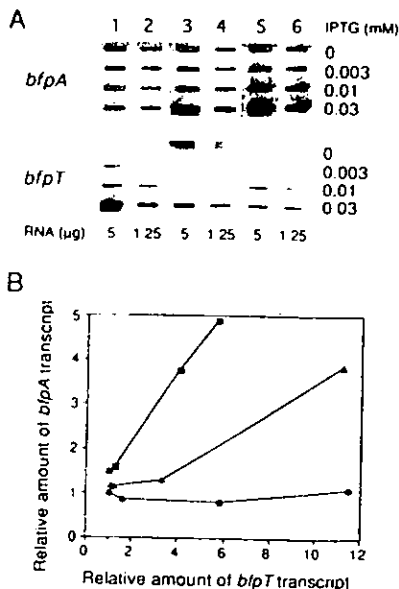


Fig. 4. The contribution of *bfpV* and *bfpW* to the activation of *bfpA* transcription. RNA was extracted from bacteria grown in DMEM 2 h after adding IPTG (0, 0.003, 0.01, 0.03 mM) to the medium. Total RNA (5 µg, 125 µg) was blotted onto a Zeta membrane and *bfpA* or *bfpT* mRNA was detected by using ³²P labelled RNA probes specific for *bfpA* or *bfpT*. The strains used in this experiment were B171-4/pTB101-T (*Ptac-bfpT*), B171-4/pTB101-T1 (*Ptac-bfpT-bfpV*) and B171-4/pTB101-T2 (*Ptac-bfpT-bfpV-bfpW*).

A Autoradiographs of Northern blot analysis using the *bfpA* or *bfpT* probe. Upper panel depicts hybridization of the *bfpA* transcript. Lower panel shows hybridization of the *bfpT* transcript. Lanes 1 and 2: B171-4/pTB101-T, lanes 3 and 4: B171-4/pTB101-T1, lanes 5 and 6: B171-4/pTB101-T2.

B Response of *bfpA* transcriptional activation to changes in the *bfpT* transcriptional level. Autoradiographs were scanned by Imagequant (Molecular Dynamics) and the intensity of each signal was measured. Relative amounts of each value to the value in B171-4/pTB101-T grown in a medium without IPTG were plotted. Circle, B171-4/pTB101-T; triangle, B171-4/pTB101-T1; square, B171-4/pTB101-T2.

The T7-tagged BfpT fusion protein was purified and immobilized on Dynabeads through the anti-T7-tag antibody as described in the *Experimental procedures*. The resulting immobilized BfpT protein, 'Dynabeads-BfpT', was used for the DNA-binding assay. Two plasmids were then used to assess the DNA-binding properties of the immobilized BfpT protein: pGEM-P*bfpA*, which carries a 307 bp DNA fragment containing the *bfpA* promoter and upstream sequence, and pGEM-4Z, the same plasmid vector lacking the *bfpA* sequence, which was employed as a non-specific vector DNA control. In the experiments shown in Fig. 5A, pGEM-P*bfpA* and pGEM-4Z were mixed in a ratio of 1:3 and the mixture then incubated with Dynabeads-BfpT. The Dynabeads-BfpT was thoroughly washed in a binding buffer and the specifically

bound DNA then eluted in a high-salt buffer. Bound DNA (i.e. the DNA that eluted in the high-salt buffer) and unbound DNA (i.e. the DNA recovered from the supernatant of the incubation mixture prior to the washing step) were analysed by agarose gel electrophoresis (Fig. 5A). Although both plasmid DNAs were recovered in the bound DNA fraction (Fig. 5A, lane 2), the relative amount of pGEM-P*bfpA* in this fraction was substantially greater than the amount of pGEM-4Z. As expected from this result, the ratio of pGEM-P*bfpA* to pGEM-4Z in the unbound fraction greatly decreased (Fig. 5A, lane 3). Taken together, these results show that most of the pGEM-P*bfpA* DNA was recovered as bound DNA, while most of the pGEM-4Z DNA was recovered as unbound DNA. In experiments conducted with Dynabeads lacking the T7-tagged BfpT protein, no detectable DNA was recovered in the bound fraction and, as expected, all of the DNA

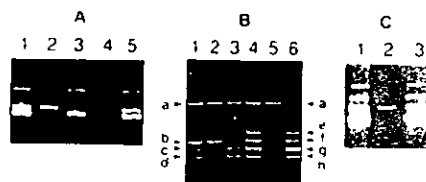


Fig. 5. Binding of the immobilized T7-tag-BfpT fusion protein to DNA.

A Binding of plasmids with or without *bfpA* promoter DNA. pGEM-P*bfpA* DNA (0.05 µg) and 0.15 µg of pGEM-4Z DNA were incubated with Dynabeads-BfpT or with the Dynabeads-anti-T7-tag (minus BfpT) negative control. Then DNA in the unbound fraction (i.e. the supernatant before washing), and in the bound fraction (i.e. DNA released in high-salt buffer) were precipitated by ethanol and resuspended in 10 µl of TE buffer. A 5 µl aliquot of each sample were mixed with loading buffer and analysed by 1% agarose gel electrophoresis. DNA was visualized by ethidium bromide staining. Lane 1, input DNA mixture, lane 2: DNA bound to Dynabeads-BfpT, lane 3: DNA bound to Dynabeads-BfpT, lane 4: DNA bound to the Dynabeads-anti-T7-tag (minus BfpT) negative control, lane 5: DNA unbound to the Dynabeads-anti-T7-tag negative control. In these electrophorograms, the lower band and second lower band correspond to pGEM-4Z and pGEM-P*bfpA* in the closed-circular form, respectively.

B Binding of Dynabeads-BfpT to deletion derivatives of *PbfpA* fragments. Dynabeads-BfpT was incubated with a mixture of DNA fragments. Bound DNA and unbound DNA were separated on a 5% polyacrylamide gel followed by ethidium bromide staining. Lane 1, input of 5 deletion DNA mixture, lane 2: DNA bound to Dynabeads-BfpT in 5 deletion mixture, lane 3: DNA unbound to Dynabeads-BfpT in 5 deletion mixture, lane 4: input of 3 deletion DNA mixture, lane 5: DNA bound to Dynabeads-BfpT in 3 deletion mixture, lane 6: DNA unbound to Dynabeads-BfpT in 3 deletion mixture. The eight fragments studied in this experiment are depicted by the following letters: (a) intact *PbfpA* fragment, (b) 5 del94, (c) 5 del75, (d) 5 del55, (e) 3 del35, (f) 3 del55, (g) 3 del79, and (h) 3 del97.

C Binding to *PaeA* or pGEM-4Z DNA. pGEM-P*aeeA* DNA (0.05 µg) and 0.15 µg of pGEM-4Z DNA were incubated with Dynabeads-BfpT. Lane 1, input DNA mixture, lane 2: DNA bound to Dynabeads-BfpT, lane 3: DNA unbound to Dynabeads-BfpT. Lower band and second lower band correspond to pGEM-4Z and pGEM-P*aeeA* in closed circular form, respectively.

remained in the unbound fraction (Fig. 5A, lanes 4 and 5). Therefore, BfpT binds DNA and its affinity for *bfpA* promoter DNA is substantially greater than for vector DNA.

Because of the low concentrations of BfpT produced, we were unable to further localize the DNA sequence to which BfpT binds using conventional footprinting experiments. Therefore, we employed a variation of the binding experiments described above to learn more about the size and location of the *bfpA* upstream region that is required for BfpT binding. For this purpose, a series of DNA fragments containing segments of the *bfpA* promoter region deleted either from the 5' end ('5' del') or from the 3' end ('3' del') was prepared by polymerase chain reaction (PCR) amplification using pSS9, and purified. These fragments were: 308 bp from nucleotide position (with respect to the transcription start site) -231 to +77 (*PbfpA*); 171 bp from -94 to +77 (5'del94); 152 bp from -75 to +77 (5'del75); 132 bp from -55 to +77 (5'del55); 197 bp from -231 to -35 (3'del35); 177 bp from -231 to -55 (3'del55); 153 bp from -231 to -79 (3'del79); and 135 bp from -231 to -97 (3'del97). Three 5'del fragments plus *PbfpA* or four 3'del fragments plus *PbfpA* were incubated with Dynabeads-BfpT and the bound DNA and unbound DNAs were separated by polyacrylamide gel electrophoresis. The binding assay with the 5'del fragments showed that 5'del94 as well as *PbfpA* bound to Dynabeads-BfpT, whereas the other two 5'del fragments did not (Fig. 5B). The binding test with the 3'del fragments showed that 3'del35 and 3'del55 as well as *PbfpA* bound to BfpT, whereas 3'del79 and 3'del97 did not (Fig. 5B). However, the binding efficiencies of 3'del35 and 3'del55 were relatively low compared with *PbfpA* (compare relative amounts in each fraction in Fig. 5B). These results indicate that BfpT binds sequence which spans nucleotides -55 to -94 of the *bfpA* promoter. Moreover, the results also suggest that the sequence downstream of -35 may contribute to the stable binding of BfpT.

eaeA, a gene on the EPEC chromosome that encodes intimin and is required for the intimate adherence of EPEC to human cells (Jerse *et al.*, 1990; Donnenberg and Kaper, 1991; Donnenberg *et al.*, 1993), has recently been shown to be regulated by the EAF-plasmid-encoded genes *perA*, *perB*, and *perC* (Gomez-Duarte and Kaper, 1995). The published nucleotide sequence of *perA* is similar to that of *bfpT* except for seven bases, indicating that the two genes probably comprise part of the same regulatory locus on the EAF plasmid. Therefore, we conducted experiments to determine if the BfpT protein might also bind *eaeA* promoter DNA. For this purpose we prepared pGEM-PeaeA, which carries 350 bp upstream and 260 bp downstream sequence (relative to the transcription start site, Jerse *et al.*, 1990; Gomez-Duarte and Kaper, 1995) of the *eaeA* promoter. This plasmid and its parental plasmid pGEM-4Z were then incubated with Dynabeads-BfpT,

and the DNA bound to Dynabeads-BfpT was compared with DNA in the input mixture and in the unbound fraction (Fig. 5C). pGEM-PeaeA was recovered in the bound DNA fraction and the amount of pGEM-PeaeA DNA in the unbound DNA fraction decreased greatly compared with the level found in the input DNA mixture. By contrast, most of the pGEM-4Z DNA was recovered in the unbound fraction. These results indicate that the BfpT protein also binds to a DNA fragment containing the *eaeA* promoter region and suggest that this event might activate *eaeA* transcription.

EAF plasmid localization of the *bfpT* locus

To map the location and orientation of *bfpT* with respect to other EAF plasmid loci, a partial EAF-plasmid map was constructed from Southern blot hybridization data using several DNA probes generated from the EAF plasmid. *bfpT* maps approx. 18 kb downstream of *bfpA* (data not shown); between *bfpA* and *bfpT* are the downstream genes of the *bfp* operon, whose protein products are homologous with membrane 'traffic wardens' of the type II, *sec*-dependent general secretory pathway (Sohel *et al.*, 1996). The orientation of *bfpT* and *bfpA* is the same and *bfpT* is separated from *bfpL*, the last gene of the *bfp* operon, by 6 kb (data not shown). Therefore, although *bfpT* and the *bfp* operon whose expression it appears to regulate (i.e. the *bfp* operon) are located on the same plasmid, they are not contiguous.

Discussion

We have shown that BFP filament biogenesis and function are encoded by an operon of 14 genes on the EAF plasmid whose expression is regulated at the transcriptional level during the exponential phase of growth by 'environmental' factors that EPEC might encounter in the proximal small intestine (Puente *et al.*, 1996; Sohail *et al.*, 1996; S. Ramer, D. Bieber, and G. K. Schoolnik, submitted) and the work reported here we used a *bfpA*-*cat* reporter system to identify a transcriptional regulatory locus (the '*bfpT* locus') on the EAF plasmid which contains genes that encode *trans*-acting factors required for the transcription of *bfpA*, the most 5' gene of the *bfp* operon. Construction and testing of the *bfpT*::Gm^r mutant showed that *bfpT* is required for *bfpA* transcription, production of the Bfp protein and expression of the LA phenotype.

The *bfpT* locus contains three genes, designated *bfpT*, *bfpV* and *bfpW*, which are predicted to encode 3' 5.8 kDa, 14.6 kDa and 10.5 kDa proteins, respectively. Because these genes are predicted to be transcribed in the same direction and are closely spaced we propose that they constitute a single operon which we have designated the '*bfpT* operon'. This supposition was borne out by

complementation tests of the *bfpT::Gm^R* insertion mutation, which showed that expression of *bfpA* in the *bfpT::Gm^R* mutant could not be restored by introduction of the plasmid harbouring *bfpT* alone, but could be restored by a DNA fragment containing all three genes. This result strongly suggested that expression of *bfpV* and *bfpW* in the *bfpT::Gm^R* mutant is also disrupted by the insertion mutation in the *bfpT* gene and that the three genes are transcribed from a promoter located upstream of *bfpT*. However, formal proof for the operonic nature of *bfpTVW* will require further study, including the detection of a polycistronic transcript.

bfpW, which is predicted to encode a 90 amino acid protein, was shown to be necessary for activation of *bfpA* expression. Introduction of two plasmids, pMW119Tp-9P, which carries *bfpT* alone, and pACYC-W, which carries *bfpW* alone, restored *bfpA* mRNA expression, BfpA protein production and the LA phenotype in the *bfpT::Gm^R* mutant. From this result, it seems likely that *bfpW* encodes a *trans*-acting factor, which acts either on the BfpT protein or on the *bfpA* promoter. The two plasmids used in these complementation experiments were derivatives of two low-copy-number vectors (pMW119Tp or pACYC177). Nonetheless, it is likely that the copy number of the cloned *bfpT* and *bfpW* genes using these plasmids is greater than normal (i.e. the EAF-plasmid copy number is estimated to be between one and three), and may have resulted in the production of higher-than-normal amounts of BfpT and BfpW. This, in turn, may have been enough to overcome the absence of *bfpV*, which was also shown to enhance *bfpA* transcription by experiments that compared the levels of *bfpA* transcription in the strain harbouring *bfpT* alone (B171-4/pSS9, pTB101-T) with levels in the strain harbouring *bfpT* and *bfpV* (B171-4/pSS9, pTB101-T1). These experiments showed that *bfpA* transcription in the strain harbouring both genes (*bfpT* plus *bfpV*) was much higher than that in the strain harbouring only *bfpT*. Therefore, *bfpV* also appears to serve as a positive cofactor for the activation of *bfpA* transcription.

Further support for the idea that both BfpW and BfpV affect *bfpA* transcription comes from experiments showing that the level of *bfpA* transcription in the strain carrying *bfpT* and *bfpV* (B171-4/pSS9 plus pTB101-T1) was lower than the level in the strain carrying all three genes that comprise the *bfpT* locus (B171-4/pSS9 plus pTB101-T2). Taken together, these results and the results discussed above show that while BfpT with BfpV and BfpT with BfpW can activate transcription, all three products are required for full transcriptional activation of *bfpA*.

Analysis of the deduced BfpT amino acid sequence showed that it belongs to the XylS/AraC family of transcriptional factors that regulate functions concerned with pathogenesis or with the metabolism of carbon sources

(Gallegos *et al.*, 1993). In common with other members of this family, it contains a helix-turn-helix motif in the C-terminal region. For AraC, the best-studied member of this family, this domain is thought to bind promoter-sequence DNA and thus mediate transcriptional activation of the corresponding gene or operon. Among members of the AraC family, BfpT also exhibits extensive homology, in the N-terminal third of the protein, with a subfamily of transcriptional regulators that activate virulence-associated genes, including VirF of *Shigella flexneri*, CfaD of uropathogenic *E. coli*, Rns and FapR of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) and AggR of enteroaggregative *E. coli* (EAggEC). Like BfpT, these regulators are necessary for the environmentally mediated expression of virulence factors. A further common feature of these virulence-associated regulator genes is their relatively low GC content (27.6%–31.7%) when compared with the c. 50% GC content of *Escherichia* and the shigellae. This suggests that these regulatory genes may have originated from the same low-GC-content ancestral source.

It is likely that the less-conserved, N-terminal half of BfpT plays a role in regulator-specific modulation of *bfpA* transcription either by sensing environmental changes or by interacting with other mediating factors. However, the finding that ammonium has little effect on *bfpT* transcription *per se* (T. Tobe, unpublished observation), but a significant negative effect on *bfpA* transcription (Puente *et al.*, 1996), may indicate that ammonium itself or another regulatory protein that responds to environmental ammonium concentrations interacts directly with BfpT to reduce its DNA-binding affinity. Alternatively, the promoter region of *bfpA* might also be affected by regulators in addition to BfpT. Beyond the presence of this region of less-conserved N-terminal sequence, BfpT differs most dramatically from other AraC-like proteins in its requirement for two additional proteins, BfpV and BfpW, to maximally activate *bfpA* transcription. As we have demonstrated here that BfpT binds to *bfpA* and *eeeA* promoter DNAs in the absence of BfpV and BfpW, it is possible that the capacity of BfpT to activate transcription is modulated by BfpV and/or BfpW through interactions with an N-terminal domain of BfpT rather than by binding upstream promoter-sequence DNA. To clarify these issues, further studies that are beyond the scope of this report are required to clarify how BfpV and BfpW enhance the transcriptional activating function of BfpT.

Immobilized BfpT (Dynabeads-BfpT) was shown to preferentially bind plasmid DNA containing the *bfpA* promoter-sequence, and binding tests with a series of deletion derivatives of this region clearly showed that the segment spanning nucleotides -55 to -94 was sufficient for the stable binding of BfpT to DNA. Therefore, this information and the data discussed above show that *bfpT* is required for *bfpA* expression and that the level of *bfpTVW* expression

is positively correlated with the level of *bfpA* expression, and that BfpT binds the upstream promoter region of *bfpA*. Taken together, these results suggest, but do not prove, that the binding of BfpT to the *bfpA* upstream region directly activates the transcription of *bfpA*. Additional studies will be required to determine if and how the physical association of BfpT with nucleotides within the region -55 to -94 activates *bfpA* transcription.

DNA from the *eaeA* promoter region was also shown to bind to BfpT, a finding that supports and extends the observations of Gomez-Duarte and Kaper (1995) who identified the EAF-plasmid-encoded regulator, *per*, which contains genes, homologous to *bfpTVW*, that are involved with the expression of *eaeA*. Although a track of G and A is found specifically in this region of the *bfpA* upstream promoter sequence, the same sequence was not found upstream of *eaeA*. Thus, while the specific sequence to which BfpT binds could not be incriminated by comparing the upstream regions of *bfpA* and *eaeA*, these results strongly suggest that BfpT is required not only for the expression of *bfpA*, but possibly for the transcription of other genes that comprise a regulon, including *eaeA*. If so, it is likely that *bfpTVW* is required for the co-ordinate regulation of the *bfp* operon and *eaeA* by environmental factors and that the expression of these genes at the same place and time by EPEC is important for its pathogenicity.

Experimental procedures

Bacterial strains and plasmids

The strains and plasmids used in this study are listed in Table 1.

DNA technology

All DNA manipulations were performed by standard genetic and molecular techniques (Ausubel *et al.*, 1989; Sambrook *et al.*, 1989). Restriction and DNA-modifying enzymes were obtained from New England Biolabs, Inc. and used according to the manufacturer's instructions. Radiolabelled nucleotides [γ - 35 S]-dATP (1000 Ci mmol $^{-1}$), [γ - 32 P]-UTP (3000 Ci mmol $^{-1}$) and [γ - 32 P]-dCTP (3000 Ci mmol $^{-1}$) were purchased from Amersham Corp. Oligonucleotides were purchased from Operon Technologies Inc. PCR reactions were performed in 100 μ l or 50 μ l volumes using AmpliTaq, according to the manufacturer's instructions.

Construction and screening of EAF-plasmid libraries

EAF-plasmid libraries were constructed as follows. Plasmid DNA was purified from strain B171-8 using a Qiagen plasmid DNA purification kit, then digested with *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Hinc*II or *Sac*I. The fragments were cloned into the kanamycin-resistance low-copy-number vector pWKS130 (Wang and Kushner, 1991), which allows selection of recombinant clones

by selection of white colonies when grown on LB agar plates containing Xgal plus IPTG. After transformation into *E. coli* DH5 α , plasmid libraries showing a white/blue ratio of at least five were removed for plasmid preparation. Plasmid preparations from each library were digested with the appropriate restriction enzyme and analysed by agarose gel electrophoresis in order to compare their restriction profiles with profiles of the EAF-plasmid digested with the same enzyme.

To screen for the gene responsible for *bfpA* activation in EPEC, plasmid DNA from the different EAF-plasmid libraries was transformed into *E. coli* DH5 α carrying pCAT642E Kanamycin- (50 μ g ml $^{-1}$) and ampicillin (200 μ g ml $^{-1}$)-resistant colonies were removed from the plate and suspended in DMEM plus 0.45% glucose containing both antibiotics. After 4 h of growth at 37 $^{\circ}$ C (conditions that allow accumulation of chloramphenicol acetyltransferase in clones carrying a gene able to induce expression of CAT by pCAT642B), 1:1000 dilutions of these cultures were plated onto LB agar containing chloramphenicol (50 μ g ml $^{-1}$) plus ampicillin and kanamycin. Plasmid DNA from chloramphenicol-resistant colonies was compared by restriction analysis, using the appropriate enzymes, to determine if all resistant colonies carried the same EAF-plasmid fragment cloned into pWKS130. After confirming the uniqueness of the EAF-plasmid insert in the chloramphenicol-resistant clones, undigested plasmid DNA (previously used for restriction analysis), was used to transform *E. coli* DH5 α . This time the transformants were selected using the kanamycin-containing media only, in order to separate the pWKS130 recombinant clones from pCAT642B. From one colony of the kanamycin-resistant clones, plasmid DNA was isolated and retransformed into *E. coli* DH5 α carrying either plasmid pCAT642B or pSS9, or EPEC strain B171-8 carrying pSS9. These transformants were then tested for CAT activity or BFP expression by Western blot.

CAT assay

The chloramphenicol acetyltransferase assay was performed as described (Puentes *et al.*, 1996).

Western blot analysis

Immunoblot analysis of BfpA expression was essentially performed as described elsewhere (Schel *et al.*, 1993; Puentes *et al.*, 1996), using a BFP-specific antiserum (Giron *et al.*, 1997).

DNA sequence analysis

Double-stranded DNA sequencing of the 3.9 kb insert of plasmid pBTA-BH1 was carried out by the dideoxy chain termination procedure (Sanger *et al.*, 1977) using Sequenase Version 2.0 according to the manufacturer's instructions (Amersham Biochemical Corp.). The software package from the Genetic Computer Group (GCG) of the University of Wisconsin (Devereux *et al.*, 1984) was used for sequence analysis.

Construction of plasmids containing the *bfpT* locus

pBTA- Δ Bm was constructed by deleting the *Bgl*II-*Bam*HI segment which contains upstream sequence of *bfpT* from

pBTA-GL3. Plasmid pBTA-1D was constructed by deleting the *Pst*I-XbaI segment (nucleotides 1563–1816), which contains two-thirds of *blpW* and downstream sequence of the cloned fragment. pBTA-9P was constructed by cloning a PCR-amplified fragment, which extends from the *Bam*HI site upstream of *blpT* to the end of *blpT* (nucleotides 1–1065), into pWKS130. pACYC-V, pACYC-VW and pACYC-W were constructed from pACYC177 by inserting the *Ssp*I-*Pst*I fragment (nucleotides 951–1563), or the *Ssp*I-*Bgl*II fragment (nucleotides 951–1816), or the *Nsp*I-*Bgl*II fragment (nucleotides 1323–1563) at the *Scal* site in the *bla* gene.

Northern hybridization

RNA was extracted from EPEC strains growing in 30 ml of DMEM containing 0.45% glucose at 37 °C by using the hot-phenol extraction method (Aiba *et al.*, 1981). Northern 'slot-blot' hybridization assays were performed on Zeta Probe Blotting Membranes (Bio-Rad Labs.), created by using the Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus (Bio-Rad Labs.), according to the manufacturer's instructions. RNA probes specific for *blpA* or *blpT* were synthesized using plasmids carrying the 700 bp *Eco*RI-*Bsp*EI *blpA* fragment or the 340 bp *Bam*HI-*Eco*RI *blpT* fragment with the MAXscript Kit (Ambion, Inc.) and [γ -³²P]-UTP.

Binding assays testing the ability of the immobilized BfpT protein to bind *blpA* promoter DNA and *eaeA* promoter DNA

Preparation of crude protein extracts of BL21(DE3)/pET-*blpT* was prepared essentially as described elsewhere (Tobe *et al.*, 1993). The T7-tagged BfpT protein was immobilized on Dynabeads M-450 Goat anti-Mouse IgG (Dynal, Oslo, Norway) through the T7-tag Monoclonal antibody (Novagen, Inc.) as follows: 4×10^7 beads of Dynabeads M-450 Goat anti-Mouse IgG was incubated with 5 µg of T7-tag Monoclonal antibody in 100 µl of PBS, 0.1% BSA at 4 °C for 30 min. After washing in PBS, 0.02% Tween-20 four times, the Dynabeads-anti-T7 tag reagent was incubated with 100 µg of protein extract from BL21(DE3)/pET-*blpT* in 200 µl of PBS, 0.02% Tween-20 at 4 °C for 30 min; then the beads were washed in PBS, 0.02% Tween-20 four times. Binding of the T7-tagged BfpT protein to the beads was confirmed by immunoblotting with anti-T7-tag antibody using beads boiled in a buffer containing 1% SDS. Following these confirmatory studies, the Dynabeads-BfpT reagent (containing the immobilized BfpT protein) was used in DNA-binding tests. To test if Dynabeads-BfpT could bind a specific DNA sequence, plasmid pGEM-P*blpA* was constructed with a DNA fragment extending from nucleotide -230 to +77, relative to the transcription start site of *blpA*. This fragment was prepared by PCR amplification and cloned into the *Bam*HI and *Hind*III sites of pGEM-4Z (Promega Corp.). pGEM-P*eaeA* was constructed by inserting a 610 bp *Eco*RI-*Bgl*II DNA fragment that extends from nucleotide -350 to +260 into the *Eco*RI-*Bam*HI sites of pGEM-4Z, pGEM-P*blpA* or pGEM-P*eaeA*, and pGEM-4Z were incubated in a ratio of 1:3 with Dynabeads-BfpT in 50 µl of binding buffer. TGED (10 mM Tris (pH 7.9) containing 5% glycerol, 1 mM EDTA and 1 mM

DTT)-0.4 M NaCl, at 4 °C for 60 min. After capturing the Dynabeads on Dynal MCP (Dynal), supernatant containing unbound DNA was transferred to new tubes. Then the Dynabeads were washed three times in binding buffer. Bound DNA was released from Dynabeads-BfpT by incubating in TGED-2.0 M NaCl, henceforth termed the 'high salt' buffer. Unbound DNA and bound DNA were precipitated by the addition of ethanol, and resuspended in 10 µl of TE buffer. Five µl of each sample were then analysed by 1% agarose gel electrophoresis or 6% polyacrylamide gel electrophoresis and the gel stained with ethidium bromide.

Nucleotide sequence accession number

The nucleotide sequence of the 3.9 kb *Bam*HI fragment will appear in the EMBL/GenBank/DOBJ nucleotide sequence data libraries under the accession number L42638 (submitted).

Acknowledgements

This research was supported by the Howard Hughes Medical Institute and by a Digestive Disease Center grant (38707). Jose Luis Puente was the recipient of an International Research Fellowship (1F05 TWO4697-01) from the Fogarty International Center, N.I.H. We thank Chen Yen Wu for expert technical assistance, and Dr Jorge Giron for providing BFP antiserum.

References

- Aiba, H., Adhya, S., and de Crombrughe B (1981) Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* 256: 11905–11910.
- Atlung, T., Nielsen, A., and Hansen, F.G. (1989) Characterization, and nucleotide sequence of *appY*, a regulatory gene for growth-phase-dependent gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171: 1683–1691.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: Greengard Publishing Associates and John Wiley and Sons.
- Bolin, I., and Wolf-Watz, H. (1988) The plasmid-encoded Yop2b protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is a virulence determinant regulated by calcium and temperature at the level of transcription. *Mol Microbiol* 2: 237–245.
- Brosius, J. (1984) Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene* 27: 151–160.
- Byrne, M.E., Rouch, D.A., and Skurray, R.A. (1989) Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. *Gene* 81: 361–367.
- Caron, J., Coffield, L.M., and Scott, J.R. (1989) A plasmid encoded regulatory gene, *rns* required for expression of the CS1 and CS2 adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 963–967.
- Cornelis, G., Sluitters, C., Lambert de Rouvroit, C. and Michiels, T. (1989) Homology between *virF* the transcriptional activator of the *Yersinia* virulence regulon and AraC the *Escherichia coli* arabinose operon regulator. *J Bacteriol* 171: 254–262.

- Cravioto, A., Gross, R., Scotland, S., and Rowe, B. (1979) An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 3: 95-99.
- D'Orazio, S.E.F., and Collins, C.M. (1993) The plasmid-encoded urease gene cluster of the family Enterobacteriaceae is positively regulated by UreR, a member of the AraC family of transcriptional activators. *J Bacteriol* 175: 3459-3467.
- Devereux, J., Haeblerl, P., and Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs of the VAX. *Nucl Acids Res* 12: 387-395.
- Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1991) Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* 59: 4310-4317.
- Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1992) Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 60: 3953-3961.
- Donnenberg, M.S., Giron, J.A., Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1992) A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol Microbiol* 6: 3427-3437.
- Donnenberg, M.S., Tacket, C.O., James, S.P., Losonsky, G., Nataro, J.P., Wasserman, S.S., Kaper, J.B., and Levine, M.M. (1993) Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J Clin Invest* 92: 1412-1417.
- Durand, J.M., Okada, N., Tobe, T., Watarai, M., Fukuda, I., Suzuki, T., Nakata, N., Komatsu, K., Yoshikawa, M., and Sasakawa, C. (1994) *vacC*, a virulence-associated chromosomal locus of *Shigella flexneri*, is homologous to *tgt*, a gene encoding tRNA-guanine transglycosylase (Tgt) of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 176: 4627-4634.
- Flores, C., Qadri, M.I., and Lichtenstein, C. (1990) DNA sequence analysis of five genes: *tnsA*, *B*, *C*, *D*, and *E*, required for Tn7 transposition. *Nucl Acids Res* 8: 901-911.
- Gallegos, M.T., Michan, C., and Ramos, J.L. (1993) The XylS/AraC family of regulators. *Nucl Acids Res* 21: 807-810.
- Giron, J.A., Ho, A.S., and Schoolnik, G.K. (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254: 710-713.
- Gomez-Duarte, O.G., and Kaper, J.B. (1995) A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 63: 1767-1776.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Higgins, D.G. (1994) CLUSTAL v: multiple alignment of DNA and protein sequences. *Meth Mol Biol* 25: 307-318.
- Higgins, D.E., Nazaeno, E., and DiRita, V.J. (1992) The virulence gene activator ToxT from *Vibrio cholerae* is a member of the AraC family of transcriptional activator. *J Bacteriol* 174: 6974-6980.
- Hobbs, M., and Mattick, J.S. (1993) Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface associated protein complexes. *Mol Microbiol* 10: 233-243.
- Hunter, S.E., Clarke, I.N., Kelly, D.C., and Tirball, R.W. (1992) Cloning and nucleotide sequencing of the *Clostridium perfringens* epsilon-toxin gene and its expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 60: 102-110.
- Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D., and Kaper, J.B. (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7839-7843.
- Klaasen, P., and de Graaf, F.K. (1990) Characterization of FapR, a positive regulator of expression of the 987P operon in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 4: 1779-1783.
- Law, D. (1994) Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 7: 152-173.
- Lundrigan, M.D., Friedrich, M.J., and Kadner, R.J. (1989) Nucleotide sequence of *Escherichia coli* porin thermo-regulatory gene *envY*. *Nucl Acids Res* 17: 800.
- Matsutani, S., Ohtsubo, H., Maeda, Y., and Ohtsubo, E. (1987) Isolation and characterization of IS elements repeated in the bacterial chromosome. *J Mol Biol* 196: 445-455.
- Nataro, J.P., Baldini, M., Kaper, J., Black, R., Bravo, N., and Levine, M. (1985) Detection of adherent factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. *J Infect Dis* 152: 560-565.
- Nataro, J.P., Maher, K., Mackie, P., and Kaper, J. (1987) Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 55: 2370-2377.
- Nataro, J.P., Yikang, D., Yingkang, D., and Walker, K. (1994) AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria 1 expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176: 4691-4699.
- Ogierman, M.A., and Manning, P.A. (1992) Homology of TcpN, a putative regulator protein of *Vibrio cholerae*, to the AraC family of transcriptional activators. *Gene* 116: 93-97.
- Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W., and Schoolnik, G.K. (1996) The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* 20: 87-100.
- Riley, L.W., Junio, L.N., Libaek, L.B., and Schoolnik, G.K. (1987) Plasmid-encoded expression of lipopolysaccharide O-antigenic polysaccharide in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 55: 2052-2056.
- Saadi, S., Maas, W.K., Hill, D.F., and Bergquist, P.L. (1987) Nucleotide sequence analysis of RepFIC, a basic replicator present in IncFI plasmids P307 and F, and its relation to the RepA replicon of the IncFII plasmids. *J Bacteriol* 169: 1836-1846.
- Sakai, T., Sasakawa, C., Makino, S., and Yoshikawa, M. (1986) DNA sequence and product analysis of the *virF* locus responsible for Congo red binding and cell invasion in *Shigella flexneri* 2a. *Infect Immun* 54: 395-402.
- Sambrook, J., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
- Savarino, S.J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B.M., Levine, M.M., Guandalini, S., and Guerry, P. (1993) Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat stable enterotoxin 1 represents

- another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3093-3097.
- Savelkoul, P.H., Willshaw, G.A., McConnell, M.M., Smith, H.R., Hamers, A.M., van der Zeijst, B.A., and Gastra, W. (1990) Expression of CFA/II fimbriae is positively regulated. *Microb Pathog* 8: 91-99.
- Sohel, I., Puente, J.L., Murray, W.J., Vuopio-Varkila, J., and Schoolnik, G.K. (1993) Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes. *Mol Microbiol* 7: 563-575.
- Sohel, I., Puente, J.L., Ramer, S.W., Bieber, D., Wu, C.-Y., and Schoolnik, G.K. (1996) Enteropathogenic *Escherichia coli*: Identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J Bacteriol* 178: 2613-2628.
- Stoner, C., and Schleif, R. (1982) Is the amino acid but not the nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *araC* gene conserved? *J Mol Biol* 171: 1049-1053.
- Strom, M.S., and Lory, S. (1993) Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu Rev Microbiol* 47: 565-596.
- Studier, F.W., and Moffat, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189: 113-130.
- Tobe, T., Sasakawa, C., Okada, N., Honma, Y., and Yoshikawa, M. (1992) *vacB*, a novel chromosomal gene required for expression of virulence genes on the large plasmid of *Shigella flexneri*. *J Bacteriol* 174: 6359-6367.
- Tobe, T., Yoshikawa, M., Mizuno, T., and Sasakawa, C. (1993) Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* of *Shigella flexneri*: activation by VirF and repression by H-NS. *J Bacteriol* 175: 6142-6149.
- Tobin, J., and Schleif, R.F. (1987) Positive regulation of the *Escherichia coli* L-thiamine operon is mediated by the products of tandemly repeated regulatory genes. *J Mol Biol* 196: 789-799.
- Wallace, R., Lee, N., and Fowler, A. (1980) The *araC* gene of *Escherichia coli*, transcriptional and translational start-points and complete nucleotide sequence. *Gene* 12: 179-190.
- Wang, R.F., and Kushner, S.R. (1991) Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* 100: 195-199.
- Wheatcroft, R., and Laberge, S. (1991) Identification and nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* insertion sequence ISRm3: similarity between the putative transposase encoded by ISRm3 and those encoded by *Staphylococcus aureus* IS256 and *Thiobacillus ferrooxidans* IST2. *J Bacteriol* 173: 2530-2538.
- Zhang, H.-Z., Lory, S., and Donnenberg, M.S. (1994) A plasmid-encoded prepilin peptidase gene from enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176: 6885-6897.

Apéndice II



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL
ESTADO DE DURANGO

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DE LA EXPRESION DEL ACTIVADOR
TRANSCRIPCIONAL B₁pT DE *Escherichia coli*
ENTEROPATOGENA (EPEC).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARTHA GUADALUPE SOSA MACIAS



VICTORIA DE DURANGO, DGO.

.997

Universidad Juárez del Estado de Durango

Escuela de Ciencias Químicas



A QUIEN CORRESPONDA:

La Suscrita Secretaria Académica de la Escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, hace C O N S T A R:

Que el (la) C. M en C. VICTOR H. BUSTAMANTE SANTILLAN, fué Asesor Externo del trabajo de tesis titulado ESTUDIO DE LA EXPRESION DEL ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL BfpT DE Escherichia coli ENTEROPATOGENA (EPEC); que para obtener el Titulo de QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO, presentó el (a) C. SOSA MACIAS MARTHA GUADALUPE , el día 16 de Mayo de 1997. a las 18:00 hrs.

Se expide la presente para los fines y usos legales que estime convenientes en la Ciudad de Victoria de Durango, Dgo., a los diez y seis días del mes de Mayo de mil novecientos noventa y siete.

ATENTA ATENCION
"POR MI PENA EN LA VIDA DEL ESPIRITU"
LA SECRETARIA ACADÉMICA

ING. MARTHA EULALIA MUÑOZ MARTINEZ.

UJED

c.c.p. Expediente.

Apéndice III

Analysis of *cis*-Acting Elements Required for *bfpA* Expression in Enteropathogenic *Escherichia coli*

VICTOR H. BUSTAMANTE, EDMUNDO CALVA, AND JOSE LUIS PUENTE*

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

Received 3 December 1997/Accepted 25 March 1998

bfpA expression in enteropathogenic *Escherichia coli* is regulated by growth medium, temperature, and ammonium concentration and requires the BfpT protein (also called PerA), a member of the AraC family of transcriptional activators. Site-directed and PCR random mutagenesis, as well as deletion analysis of the *bfpA* upstream regulatory region, supported assignment of the promoter elements and demonstrated that the *cis*-acting elements that mediate BfpT-dependent regulation of *bfpA* are located between positions -85 and -46. Interestingly, this region shares 73% identity with a 40-bp-long AT-rich tract located upstream of the *bfpT* gene, which is essential for *bfpT* autoregulation.

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a common cause of diarrhea, particularly among children under 6 months of age living in developing countries (16). Recently, a three-stage model by which EPEC infections proceed has been proposed (6). The initial stage involves the generalized nonintimate interaction of bacterial microcolonies with the surface of epithelial cells, in a pattern known as the localized adherence phenotype (5). This pattern of attachment requires the 80-kb EPEC adherence factor (EAF) plasmid, which contains a cluster of 14 tandemly arrayed genes; this cluster is sufficient to direct the production of the bundle-forming pilus (BFP), a type IV fimbria associated with microcolony formation and bacterial autoaggregation (8, 21, 23-25).

The expression of *bfpA*, the gene coding for the structural subunit of BFP (23), occurs during the exponential phase of growth, when it is modulated by the growth medium, ammonium concentration, and temperature (19). Our previous studies revealed that *bfpA* regulation is under the control of a regulatory region that extends further upstream from the putative -35 and -10 promoter sequences, which seems to determine the coordinate regulation of genes located downstream of *bfpA* (19, 21). This expression is regulated at the transcriptional level and requires the product of the *bfpT* gene, which is the first gene of the *bfpTVW* locus, localized 6.7 kb downstream of the *bfp* gene cluster on the EAF plasmid (27). *bfpT* encodes a 274-amino-acid protein, which belongs to the XylS-AraC family of transcriptional regulators (27). The *bfpTVW* locus, previously identified as *per*, has also been involved in the regulation of the *caeA* and *esp* genes, whose products mediate the second and third stages of EPEC interactions with the host cells (6, 9, 12).

Interactions of BfpT with its target sites have been difficult to study *in vitro*, since different attempts to overproduce and purify it have been unsuccessful. We previously showed that a DNA fragment containing the sequence between nucleotides -94 and -55 of the *bfpA* regulatory region was bound by a T7-tagged BfpT fusion protein immobilized on Dynabeads; however, attempts to perform footprinting experiments with this fusion were unsuccessful (27). Thus, an alternative route

was to genetically analyze the *bfpA* regulatory region, as presented here.

Deletion analysis of the *bfpA* regulatory region. A series of 5' upstream deletions of the *bfpA-cat* fusion carried on plasmid pCAT232 (19), containing all of the required elements for expression, were constructed by PCR amplification of the corresponding fragments and cloned into vector pKK232-8, which contains a promoterless *cat* gene (2). The nucleotide sequence of all cloned inserts was determined to confirm the precise positions of the deletions and to ensure that no mutations were introduced by the amplification reaction. The chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity directed by plasmids carrying these *bfpA-cat* deletions was tested in EPEC B171-8 grown in Dulbecco modified Eagle (DME) medium at 37°C, which are the optimal conditions for *bfpA* expression, and under conditions that are known to regulate *bfpA* expression, such as growth in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C, DME medium at 25 and 39°C, and DME medium containing 15 mM ammonium sulfate at 37°C, as described before (19).

This analysis (Fig. 1) showed that a *bfpA-cat* deletion down to position -85 (pCAT85) had similar levels of expression and the same regulatory pattern in response to environmental cues as other fusions containing further upstream sequences. Also, a deletion to position -77 (pCAT77) showed an 84% reduction of the BfpT-dependent expression, although, interestingly, it still responded to regulatory signals to the same extent as the wild type. In contrast, only background activity was detected for deletions to position -54 or -40 (pCAT54 or pCAT40), both of which still contain the promoter (Fig. 1 and data not shown). These results indicated that the sequences required for BfpT-dependent expression of *bfpA* are located upstream of the -35 region and up to position -85.

This AT-rich region contains two 8-bp-long direct-repeat elements, as well as two 10-bp-long inverted-repeat elements, which were designated IRS1 and IRS2 (Fig. 2). Although the precise role of these elements in BfpT binding remains unclear, since they are not sufficient for full activation (Fig. 2), it should be noticed that binding to tandem elements has been reported for other members of the AraC family, such as AraC, MelR, and VirF (3, 14, 28). Moreover, AT-rich sequences are necessary for the regulatory activity of other, closer homologs of BfpT, such as Rns and CfaI (regulation of the CS1 and CFA/I fimbrial operons in enterotoxigenic *E. coli*, respectively, vs (11, 18) and VirI (regulation of plasmid-encoded invasion

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Biotecnología, UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico. Phone: (52) (73) 29-1621. Fax: (52) (73) 13-8673. E-mail: puente@ibt.unam.mx

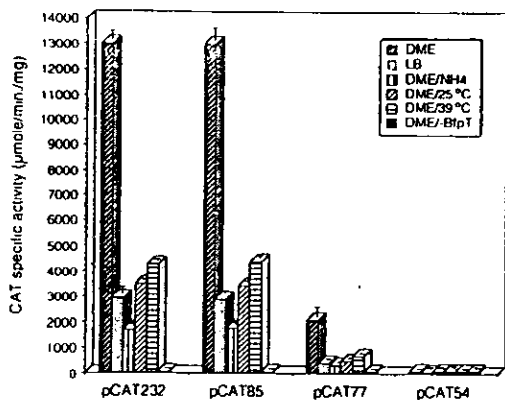


FIG. 1. Regulation of the *hfpA* 5' regulatory region deletion fusions in response to environmental cues. The activities of plasmids pCAT232, pCAT85, pCAT77, and pCAT54 were tested in EPEC strain B171-8 grown in DME medium at 37, 25, and 39°C, in LB medium at 37°C, or in DME medium containing 15 mM ammonium sulfate at 37°C or in EPEC strain T:Gm', a *hfpT* mutant derived from strain B171-8 (27), grown in DME medium at 37°C. The graph shows the maximal CAT-specific activity reached late in growth. The data are representative of at least three different experiments.

proteins in *Shigella* species (26). Interestingly, another common feature of Rns, CfaD, and VirF is that they seem to overcome the negative regulation by H-NS at their respective promoters, a mechanism that might also account for *hfpA* repression at temperatures below 37°C (11, 18, 26).

Mutational analysis of the *hfpA* regulatory region. To pinpoint the position of cis-acting regulatory elements required for *hfpA* expression, random mutations were generated in the *hfpA* regulatory region contained in pCAT232, which was amplified under PCR conditions that enhance error-prone copying, as described previously (15). The PCR products were subcloned back into vector pKK232-8 (Amp^r) and transformed into *Escherichia coli* HB101 carrying plasmid pBTA-BH1 (Km^r), which contains the *hfpT* regulatory locus (27). Mutations that reduced *hfpA-cat* expression were identified by selecting colonies that did not grow in concentrations of chloramphenicol noninhibitory for strains carrying the wild-type fusion (pCAT232), while transformants carrying mutations that improved *hfpA-cat* expression were screened for their abil-

ity to grow in a chloramphenicol concentration that inhibits the growth of a strain carrying the wild-type fusion. Candidates were assayed for CAT activity, as described before (19). Plasmid DNA from these clones was purified and the nucleotide sequence of the *hfpA-cat* regulatory region was determined, allowing the identification of two groups of mutations.

Promoter mutations. The sequence of the -35 promoter region of *hfpA* (TTGCGT) contains the most conserved residues of the consensus hexamer (TTGACA) at the first three positions. A T-to-C transition (T-35C) or a G-to-A transition (G-33A), at the first and third positions, respectively (Fig. 2), decreased expression of *hfpA* to the background level, showing that this sequence is critical for *hfpA* expression, in contrast to what is observed for the majority of the positively controlled promoters (20). Furthermore, a G-to-T transversion at position -29 (G-29T; 1 base downstream from the -35 hexamer) produced nearly a twofold increase in *hfpA-cat* expression under all growth conditions tested (Fig. 2 and 3B). This mutation did not modify the transcriptional start point (see below; Fig. 4B, lane 2) and caused a ninefold increase in the basal BtpT-independent expression levels (Fig. 3B), suggesting that it generated a stronger promoter. This is consistent with the fact that, in *E. coli* promoters, a T is the most frequently found residue 1 base downstream from the -35 hexamer (10).

Moreover, to better characterize the *hfpA* promoter, two site-directed mutations at the -10 hexamer were independently generated by PCR (1). A T-to-G transversion at position -7 (T-7G) that reduced the identity of the putative -10 region with the consensus sequence abolished *hfpA-cat* expression (Fig. 2), whereas a G-to-T transversion at position -12 (G-12T) (pSNE10-232), which brought the similarity of the putative -10 region closer to the consensus, caused more than a twofold increase in CAT activity, although its regulation in response to environmental cues was similar to that of the wild-type fusion (Fig. 2 and 3B). Interestingly, in the absence of the *hfpA-cat* basal level of expression (Fig. 3B), primer extension analysis of this promoter mutant showed that transcription initiates at the wild-type position either in the wild-type EPEC strain or in its *hfpT* mutant derivative (Fig. 4A and B, lanes 3, and 4), ruling out the possibility of having generated an alternative promoter. In summary, these results further support the assignment of the *hfpA* promoter (Fig. 2).

Mutations upstream of the promoter. Further analysis of mutants with mutations randomly generated by PCR revealed that single deletions or a single insertion at different positions upstream from the promoter but downstream from the -35

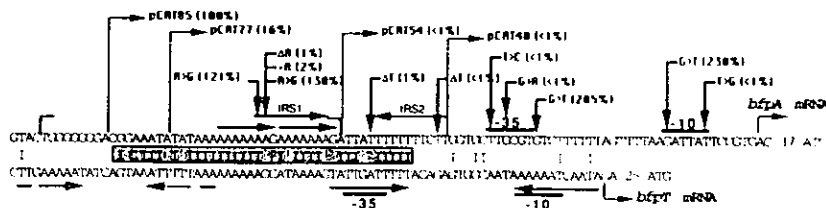


FIG. 2. Nucleotide sequence alignment of the *hfpA* (upper line) and *hfpT* (lower line) regulatory regions. The upstream regulatory sequence contains all of the cis-acting elements required for the BtpT-dependent activation of *hfpT* (this work). The *hfpA* sequence between positions -35 and -10 is identical over a 40-bp-long region (shaded bar) with the sequence between positions -65 and -26 of the *uidA* regulatory region, which has been shown to be required for *hfpT* autoactivation (17). Brackets indicate the region bound by a 17-bp BtpT fusion protein (27). Thin and thick broken arrows and arrows with open and closed heads, respectively, that affected CAT activity. The activities listed in parentheses are expressed as percentages of pCAT232 activity with an assigned value of 100% (see Fig. 1). Horizontal arrows above or below the sequences denote the positions of HNS- or direct repeat elements. The -35, -10, and the transcription start sites are also indicated.

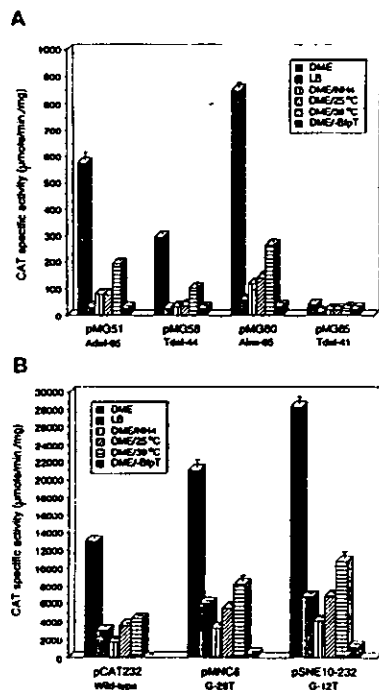


FIG. 3. Regulation of selected *bfpA* 5' regulatory region mutants. The activities of *bfpA-cat* fusions containing down mutations (pMG51, pMG58, pMG60, and pMG65) (A) or promoter mutations (pMNC6 and pSNE10-232) (B) were tested in EPEC strain B171-8 grown in DME medium at 37, 25, and 39°C, in LB medium at 37°C or in DME medium containing 15 mM ammonium sulfate at 37°C or in strain T:Gm^r, a *bfpT* mutant EPEC strain, grown in DME medium at 37°C. The graph shows the maximal CAT-specific activity reached late in growth. The data are representative of at least three different experiments.

position (e.g., an insertion or a deletion of one A at the 10-A tract between positions -65 and -74, a deletion of one T at the 8-T tract between positions -44 and -51, or a deletion of one T between positions -41 and -42 [plasmids pMG60, pMG51, pMG58, and pMG65, respectively]) decreased *bfpA* expression to less than 2% (Fig. 2 and 3A). Interestingly, this reduced level of expression still required BfpT and was regulated by the growth medium, temperature, and ammonium concentration (Fig. 3A).

This negative effect could have resulted from slight but significant local distortions in the DNA spatial structure, which would bring out of phase the BfpT-binding sites with respect to the promoter, probably altering its interactions with other molecules, i.e., RNA polymerase. In this regard, it has been observed for other regulatory proteins, such as CRP and FNR, that the exact spacing of their binding sites with respect to the promoter is crucial for activation (7, 29). Further analysis of site-directed mutants with full or half-turn insertions will be required to test this hypothesis. In contrast, two mutants with an A-to-G transition in the same region (A-65G or A-66G) rendered only a moderate positive effect on *bfpA* expression (Fig. 2).

The PCR random mutagenesis strategy did not render a wider variety of mutations, as illustrated by those that were generated by site-directed mutagenesis. In this respect, it is

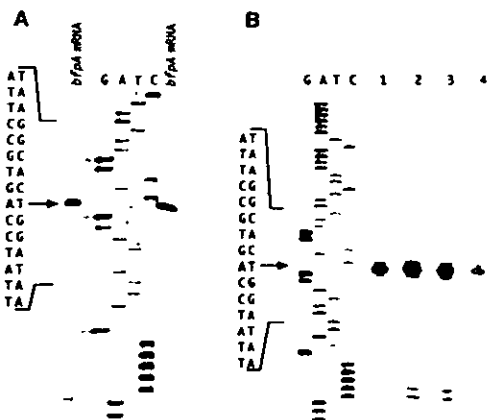


FIG. 4. Primer extension analysis of *bfpA* and *bfpA-cat* transcripts. (A) Total RNA samples extracted from EPEC strain B171-8 were hybridized to a 5'-³²P-end-labeled *bfpA* specific primer, primer extension was performed with avian myeloblastosis virus reverse transcriptase as described previously (19). Lanes C, A, T, and C correspond to the DNA sequence ladder obtained with the same primer. Arrow, the position of the extended products, which correspond to an A residue shown in boldface, 1 bp downstream from the G residue that was previously reported (19). The *bfpA* transcript is shown in lanes to the right and to the left of the sequence ladder. (B) Total RNA samples extracted from EPEC strain B171-8 carrying plasmid pCAT232 (solid type [lane 1]), pMNC6-G-257 (lane 2), or pSNE10-232 (G-12T [lane 3]) or from strain EPEC T:Gm^r carrying pSNE10-232 (lane 4) were hybridized to a 5'-³²P-end-labeled *cat*-specific primer.

also possible that the effect of other mutations is not large enough to be detected by our screening procedure, contrasting with the larger effect caused by several single-base deletion or insertion mutants, which allowed their easy and recurrent isolation. In summary, new mutagenesis and screening schemes should be explored to exhaust all the possibilities.

The BfpT-independent expression of a *bfpA* promoter mutant is still repressed in LB medium. The BfpT-independent expression showed by pSNE10-232 (Fig. 5) was still repressed

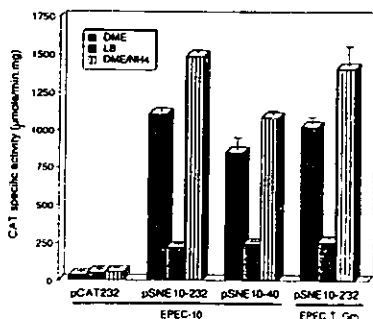


FIG. 5. Regulation of the *bfpA* 5' regulatory region mutant (G-12T) contained in pSNE10-232 and its 5' deletion derivative fused to the CAT gene. The activities of pSNE10-232 and its 5' deletion derivative pSNE10-10 were tested for EPEC strain B171-10 (EPEC 10), a spontaneous plasmidless derivative of B171-8 (this study), or for EPEC strain T:Gm^r, a *bfpT* mutant strain, grown in DME or LB medium at 37°C or in DME medium containing 15 mM ammonium sulfate at 37°C for comparison expression of the wild type fusion pCAT232 in B171-10 is also shown. The graph shows the maximal CAT-specific activity reached during the culture process. The data are representative of at least three different experiments.

in LB medium but not by ammonium. Furthermore, a derivative of this mutant with a deletion to position -40 (pSNE10-40) behaved in the same manner (Fig. 5). These observations suggested that the different levels of *bfpA* expression in LB and DME medium could be mediated by a mechanism that acts directly on its promoter, while ammonium repression occurs through a different mechanism that requires BfpT and sequences upstream of the promoter. Moreover, since *bfpA* expression is selectively repressed upon entrance to stationary phase, we cannot exclude the possibility that the different levels of expression in DME and LB medium depend, at least partially, on how long the exponential phase of growth is sustained and that this phenomenon might be directly or indirectly mediated by RpoS (19, 30).

The *bfpA* and *bfpT* regulatory regions share a common motif. Recently, we have observed that *bfpT* expression is autoregulated and also modulated by the growth medium, temperature, and ammonium concentration (17). Considering these observations, we expected that common elements could be present in the regulatory regions of *bfpA* and *bfpT*. The nucleotide sequence alignment of these regions revealed the presence, as part of the minimal regulatory region of *bfpT*, of a sequence that shares 73% identity with the region between residues -85 and -46, which was shown to mediate regulation and BfpT-dependent expression of *bfpA* (Fig. 2). In contrast, no significant sequence similarities could be found with the *bfpA* region upstream from position -84 or downstream from position -46 (Fig. 2). Interestingly, the sequence comprised between positions -84 and -65, which proved to be critical in *bfpA* activation and is part of the *bfpA*-*bfpT* homologous motif, is located two full turns further upstream in *bfpA* with respect to *bfpT*, suggesting that BfpT can activate transcription from different locations with respect to the promoter, as long as the correct phase is maintained (Fig. 2), as has been described for many regulatory proteins in *E. coli* (4, 7, 29).

Concluding remarks. This study led us to determine that the sequence between positions -85 and -55 is essential for the BfpT-dependent activation and ammonium regulation of *bfpA*, probably constituting the BfpT-binding motif. The region between positions -55 and -35, which resembles an UP element (13, 22), probably accounts for the stronger promoter activity shown by *bfpA* in comparison with that of *bfpT*, which lacks this element (Fig. 2) (17), although this hypothesis remains untested. All of this provides the basis toward further understanding the molecular mechanisms that control the expression of BFP and possibly other virulence factors in EPEC.

We particularly thank Francisco Santana for excellent technical assistance. We thank Enrique Morett for critical reading of the manuscript. J.L.P. thanks Dave Bieber for his collaborative effort and many helpful discussions at the early stage of this work.

V.H.B. was supported by a Ph.D. fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (no. 90275). This work was supported by grants from the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN208095) and from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 1027P-N).

REFERENCES

- Ali, S. A., and A. Steinkasserer. 1995. PCR-ligation-PCR mutagenesis: a protocol for creating gene fusions and mutations. *BioTechniques* 18:746-750.
- Brosius, J. 1984. Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene* 27:151-160.
- Caswell, R., C. Webster, and S. Busby. 1992. Studies on the binding of the *Escherichia coli* McIR transcription activator protein to operator sequences at the *melAB* promoter. *Biochem. J.* 287:501-504.
- Collado-Vides, J., B. Magasanik, and J. D. Gralla. 1991. Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 55:371-394.
- Cravioto, A., R. Gross, S. Scotland, and B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infant enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* 3:95-99.
- Donnenberg, M. S., J. B. Kaper, and B. B. Fintay. 1997. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol.* 5:109-114.
- Gastoo, K., A. Bell, A. Kolb, H. Buc, and S. Busby. 1990. Stringent spacing requirements for transcription activation by CRP. *Cell* 62:733-743.
- Giron, J. A., A. S. Y. Hu, and G. K. Schoolnik. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254:710-713.
- Gomez-Duarte, O. G., and J. B. Kaper. 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63:1767-1776.
- Harley, C. B., and R. P. Reynolds. 1987. Analysis of *E. coli* promoters. *Nucleic Acids Res.* 15:2343-2361.
- Jordi, B. J., H. Dagberg, L. A. de Haan, A. M. Hamers, B. A. van der Zeijst, W. Gastra, and B. E. Uhlin. 1992. The positive regulator CfaD overcomes the repression mediated by histone-like protein H-NS (H1) in the CFA/I fimbrial operon of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 11:2627-2632.
- Keeny, B., and B. B. Fintay. 1995. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7991-7995.
- Landini, P., and M. R. Volkert. 1995. RNA polymerase σ subunit binding in positively controlled promoters: a new model for RNA polymerase-promoter interaction and transcriptional activation in the *Escherichia coli* *ala* and *uidB* genes. *EMBO J.* 14:429-435.
- Lee, N., C. Franklyn, and E. Hamilton. 1987. Arabinose-induced binding of AraC protein to *araI*, activates the *araBAD* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8814-8818.
- Leung, D., E. Chen, and D. V. Goeddel. 1989. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* 1:11-15.
- Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155:377-385.
- Martinez-Laguna, Y., E. Calva, and J. L. Puente. 1997. Regulation of *bfpT*, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *abstr. H-171*, p. 313. In *Abstracts of the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology* 1997. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Murphree, D., B. Froehlich, and J. R. Scott. 1997. Transcriptional control of genes encoding CS1 pilus: negative regulation by a silencer and positive regulation by Rns. *J. Bacteriol.* 179:5736-5743.
- Puente, J. L., D. Bieber, S. W. Ramer, W. Murray, and G. K. Schoolnik. 1996. The bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol. Microbiol.* 20:87-100.
- Raibaud, O., and M. Schwartz. 1984. Positive control of transcription initiation in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 18:173-206.
- Ramer, S. W., D. Bieber, and G. K. Schoolnik. 1996. BfpB, an outer membrane lipoprotein required for the biogenesis of bundle-forming pilus in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178:6555-6563.
- Ross, W., K. Gosink, J. Salomon, K. Igarashi, C. Zou, A. Ishihama, K. Severinov, and R. L. Gourse. 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the σ subunit of RNA polymerase. *Science* 262:1407-1413.
- Sobel, L. J., L. Puente, W. Murray, J. Vuopio-Varkila, and G. K. Schoolnik. 1993. Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes. *Mol. Microbiol.* 7:563-575.
- Sobel, L. J., L. Puente, S. W. Ramer, D. Bieber, C.-Y. Wu, and G. K. Schoolnik. 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli* identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J. Bacteriol.* 178:2613-2628.
- Stone, K. D., H.-Z. Zhang, L. K. Carlson, and M. S. Donnenberg. 1995. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol. Microbiol.* 20:225-237.
- Tobe, T., M. Yoshikawa, T. Mizuno, and G. Sasakawa. 1993. Transcriptional control of the invasion regulatory gene *uifB* of *Shigella flexneri*: activation by *uifA* and repression by H-NS. *J. Bacteriol.* 175:6142-6149.
- Tobe, T., G. K. Schoolnik, L. Sobel, V. H. Bustamante, and J. L. Puente. 1996. Cloning and characterization of *bfpT* genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 21:963-975.
- Wattiau, P., and G. R. Cornelis. 1994. Identification of DNA sequences recognized by VirE, the transcriptional activator of the *Yersinia* *cop* regulon. *J. Bacteriol.* 176:3878-3884.
- Wing, H. J., S. M. Williams, and S. J. W. Busby. 1993. Spacing requirements for transcription activation by *E. coli* ENR protein. *J. Bacteriol.* 177:676-6710.
- Xu, J., and R. C. Johnson. 1995. Identification of genes negatively regulated by Fis, Fts, and RpoS: consultate growth-phase-dependent gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177:938-947.