



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES
DE LAS ISLAS DE PATOGENICIDAD 1 (SPI-1) Y 2 (SPI-2)
DE *Salmonella enterica* serovar Typhimurium
POR EL REGULADOR GLOBAL H-NS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

PRESENTA:

ELISA DEL ROSARIO TALANCÓN SÁNCHEZ

ASESOR:

DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN





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.

Agradezco

A mi asesor Víctor Humberto Bustamante Santillán,
por su enseñanza y dedicación.

A mis sinodales José Luis Puente García,
Luis Felipe Jiménez García,
María de Lourdes Segura Valdez y
Alejandro Huerta Saquero,
por su contribución al enriquecimiento
de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México,
a quien debo mi formación académica.

Al Instituto de Biotecnología, por el espacio brindado.

A mis queridos padres, quienes han sido
los andamios de mi vida.

A mis hermanos Carlos y Daniel,
por la alegría de ser su hermana.

A Jorge, mi gran compañero.

ÍNDICE

I. Resumen	6
II. Introducción	8
II.I Infecciones causadas por <i>Salmonella</i>	8
II.II Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i>	12
II.III Sistemas de secreción tipo III	14
II.IV SPI-1	17
II.V SPI-2	21
II.VI Factores ambientales que inducen la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2	25
II.VIII Mecanismo molecular que regula la expresión de los genes de SPI-1	28
II.IX Mecanismo molecular que regula la expresión de los genes de SPI-2	31
II.X H-NS, StpA y Hha	33
III. Antecedentes	37
IV. Objetivos	43
IV.I Objetivo general	43
IV.II Objetivo particular	43
IV.III Objetivos específicos	43
V. Método Experimental	44
V.I Antibióticos y dosis empleadas	44
V.II Cepas bacterianas y plásmidos empleados	44
V.III Condiciones de crecimiento	46
V.IV Electroporación	46
V.V Determinación de la actividad específica de la enzima Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT)	47
V.VI Análisis del patrón de proteínas secretadas	49
V.VII Experimento de dominancia negativa de H-NS	49

VI. Resultados	51
VI.I Análisis de la expresión de genes de <i>Salmonella</i> mediante fusiones transcripcionales al gen reportero <i>cat</i>	51
VI.II Efecto de H-NS sobre la expresión de los genes de SPI-1	54
VI.II <i>hilA-cat</i>	54
VI.III <i>sirA-cat</i>	56
VI.IV <i>hilD-cat</i>	58
VI.V <i>invF-cat</i>	61
VI.VI <i>sigD-cat</i>	63
VI.VII Análisis del efecto de H-NS sobre el patrón de proteínas secretadas por SPI-1	64
VI.VIII Efecto de H-NS sobre la expresión de los genes de SPI-2	69
VI.IX <i>ssrAB-cat</i>	69
VI.X <i>ssaG-cat</i> y <i>pipB-cat</i>	72
VII. Discusión	75
VIII. Conclusiones	84
IX. Perspectivas	88
X. Referencias	89

I. RESUMEN

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) es la bacteria causante de gastroenteritis en el humano y la que produce una enfermedad sistémica en el ratón: la fiebre tifoidea, similar a la infección producida por *S. Typhi* en el humano. Para el establecimiento de interacciones específicas con su hospedero, *Salmonella* requiere que se expresen los genes de virulencia codificados en diferentes islas de patogenicidad. La mayoría de los genes de virulencia que están codificados en la isla de patogenicidad 1 (SPI-1), son los responsables del fenotipo de invasión de *Salmonella*; mientras que los genes codificados en la isla de patogenicidad 2 (SPI-2) se requieren para la replicación intracelular de esta bacteria y por lo tanto para el establecimiento de la infección sistémica. La expresión de los genes de SPI-1 se induce a través de una cascada formada por los reguladores HilD, HilA e InvF, codificados en SPI-1. El sistema de dos componentes BarA/SirA, codificado fuera de las SPIs, activa esta cascada de regulación al inducir la expresión de *hilD*. El sistema de dos componentes SsrA/B, codificado en SPI-2, regula positivamente la expresión de los genes de SPI-2. A su vez, la expresión de este sistema de regulación es inducida por los sistemas de dos componentes OmpR/EnvZ y PhoP/PhoQ, así como por el regulador SlyA. En diferentes bacterias, la expresión de los genes de virulencia es reprimida por el regulador global H-NS, tal es el caso de los genes de SPI-1 y SPI-2. HilD induce la expresión de los genes de SPI-1 contrarrestando la represión que ejerce H-NS sobre *hilA*. En el presente estudio mostramos nuevas evidencias que permitirán entender mejor el papel que tiene H-NS sobre la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2. Mediante el análisis de la expresión de fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* y genes de SPI-1 y SPI-2, determinamos que H-NS reprime la expresión de los genes *sirA* y *hilA* del regulón SPI-1, y *ssaG* y *pipB* del regulón SPI-2. En ausencia de H-NS ya no se requiere a HilD para la expresión de *hilA*. En contraste, los reguladores HilA e InvF se requieren para la expresión de sus

genes blanco de SPI-1 aún en ausencia de H-NS. Experimentos de dominancia negativa de H-NS sobre la secreción de proteínas en mutantes de *S. Typhimurium* $\Delta hilD$, $\Delta hilA$ y $\Delta invF$ confirmaron estos resultados. Así, en conjunto, estos resultados confirman que HilD actúa principalmente como un des-represor de H-NS, e indican que HilA e InvF no actúan como des-represores de H-NS, sugiriendo que son activadores clásicos. Además, nuestros experimentos mostraron que en una mutante Δhns se expresan los genes *ssaG* y *pipB* en ausencia del sistema regulador SsrA/B; sin embargo, la presencia de SsrA/B incrementa aún más la expresión de estos genes en esta cepa mutante. Estos resultados sugieren que el sistema SsrA/B tiene un papel dual, actuando como un des-represor de H-NS y probablemente como un activador clásico de la expresión de los genes de SPI-2. Por otro lado, se encontraron evidencias que sugieren la existencia de reguladores de *S. Typhimurium* que controlan la expresión de *hilD* y *ssrA/B*, que no se encuentran en *E. coli* K12, los cuales no han sido identificados a la fecha.

II. INTRODUCCIÓN

Infecciones causadas por *Salmonella*

El género *Salmonella* agrupa a bacterias Gram negativas en forma de bacilo, que son patógenos importantes de humanos o animales (Haraga, *et. al*, 2008).

Este género se divide en dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. A su vez, la especie *enterica* se subdivide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae*. De estas subespecies, las de mayor importancia médica son la *arizonae* y la *entérica* (Su y Chiu, 2007).

La subespecie *enterica* está dividida a su vez en varios serotipos, clasificación basada en antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (Vi). De estos serotipos, los causantes de entidades clínicas en humanos son: *Salmonella enterica* serovar Typhi, causante de la fiebre tifoidea, *S. enterica* serovar Paratyphi, causante de la fiebre paratifoidea, *S. enterica* serovar Typhimurium y *S. enterica* serovar Enteritidis, causantes de gastroenteritis (Haraga, *et. al*, 2008).

S. enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) causa gastroenteritis en el humano, sin embargo, en el ratón produce una enfermedad sistémica: la fiebre tifoidea, similar a la infección producida por *S. Typhi* en el humano. Por esta razón, ha sido utilizada como modelo de estudio de la patogénesis de *Salmonella* (Marcus, *et. al*, 2000).

El proceso de infección comienza cuando *Salmonella* se ingiere a través de agua o alimentos contaminados. Una vez en el intestino, esta bacteria se adhiere apicalmente a las células epiteliales del íleon y a las células M de las placas de

Peyer (Fig. 1). Por la ausencia del borde de cepillo y del glicocalix, las células M representan una ruta eficiente para la invasión de las enterobacterias (Hansen-Wester y Hensel, 2001; Jepson y Clark, 2001).

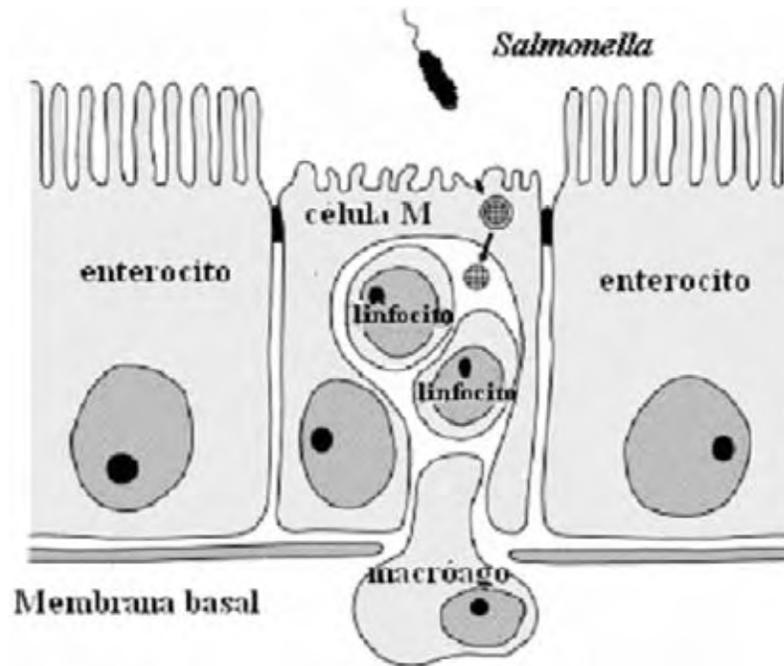


Figura 1. Las células M se caracterizan por carecer de microvellosidades (borde de cepillo) en su superficie apical y por la presencia de una invaginación citoplasmática basolateral que aloja a linfocitos y algunos macrófagos. Por esta razón, representan una ruta eficiente a través de la barrera del epitelio intestinal (Jepson y Clark, 2001).

Las adhesinas de la bacteria juegan un papel muy importante para la colonización intestinal, pues son las responsables de reconocer y de unirse a un receptor específico de la célula hospedera. La interacción con el receptor activa el sistema inmune innato del hospedero y facilita la invasión.

Las adhesinas encontradas en *S. Typhimurium* son: fimbria, fimbrilla, flagelo y lipopolisacárido (Figuroa y Verdugo, 2005).

La bacteria, al tener contacto con la superficie de las células hospederas, induce una variedad de respuestas celulares. Después de adherirse a la superficie apical de la célula, la bacteria induce rearrreglos en el citoesqueleto. De esta manera se da lugar a la formación de ondulamiento (*ruffling*) en la superficie de la célula, facilitando la internalización de la bacteria en compartimientos fagosomales (Hansen-Wester y Hensel, 2001).

Otra respuesta celular inducida por la bacteria es la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B, por lo que se produce la liberación de citocinas proinflamatorias como son: interleucina 8 (IL-8), interferón γ (IFN γ) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α), involucradas en el reclutamiento de células fagocíticas y en el proceso diarreico (García-del Portillo, 2001).

La inflamación, combinada con la pérdida de la integridad epitelial de la mucosa intestinal, incrementa la salida de líquidos y electrolitos, como lo es el cloro, al lumen intestinal; es decir, la diarrea (Fig. 2).

Los efectos citotóxicos producidos por *Salmonella* provocan la destrucción de las células M y facilitan la invasión de enterocitos adyacentes. Después de la invasión de las células, la bacteria se dirige a la parte basal del epitelio. Ahí, es fagocitada por los neutrófilos y macrófagos atraídos para poder ser transportada al hígado y al bazo (Fig. 2).

Una vez dentro del compartimiento endosomal, *S. Typhimurium* controla el tráfico y la evolución de la vacuola internalizada para formar la vacuola fagosomal que contiene a *Salmonella* (SCV) (Hautefort, *et. al*, 2007).

Dentro de SCV, *Salmonella* es capaz de sobrevivir y replicarse, siendo indispensable para esto la acidificación dentro del fagosoma (Fig. 2).

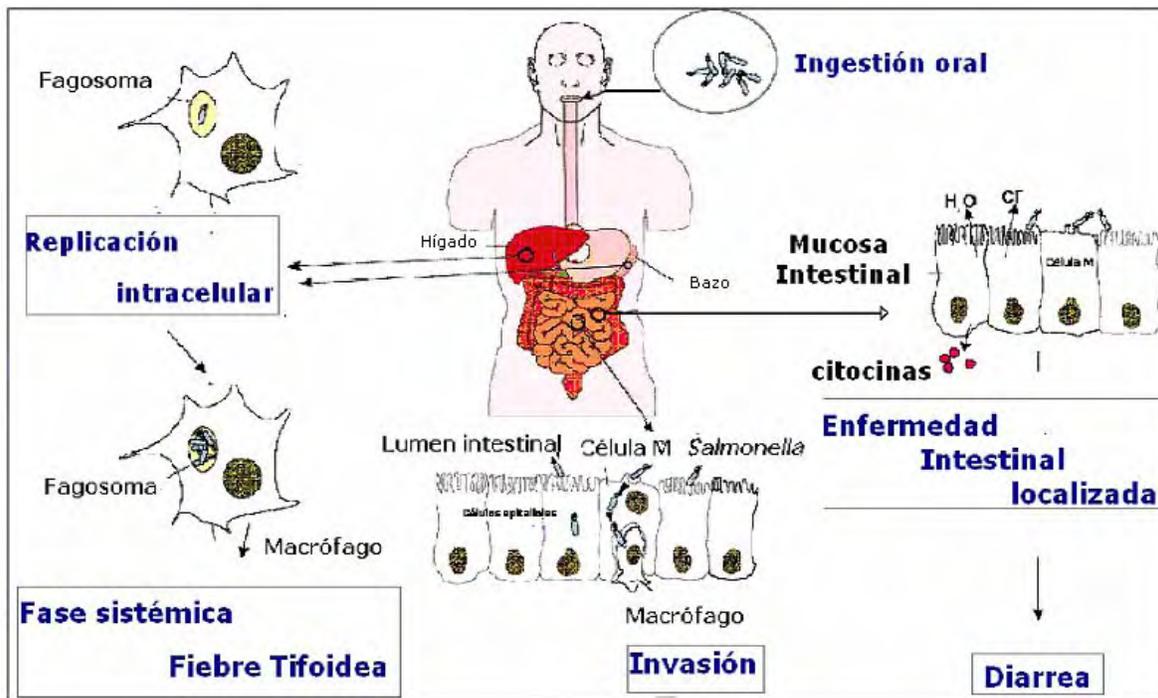


Figura 2. Representación esquemática de la interacción patógeno-hospedero durante la patogénesis de *Salmonella* (Hansen-Wester y Hensel, 2001).

Salmonella se enfrenta con cambios ambientales como son la disminución acelerada de pH, la privación de Mg^{2+} y Fe^{2+} impuesta por el hospedero y la liberación de sustancias tóxicas, como las proteasas, lisozimas y defensinas (estas últimas, al fusionarse los lisosomas con la vacuola fagosomal). Ante estos

cambios, la bacteria responde modulando la expresión de sus genes (Hansen-Wester y Hensel, 2001).

Islas de Patogenicidad de *Salmonella*

Se ha estimado que aproximadamente el 4% del genoma de *S. Typhimurium* es requerido para la infección sistémica, lo cual se traduce en más de 200 genes para la virulencia (Bowe, *et. al*, 1998). La gran mayoría de estos genes están codificados dentro de islas de patogenicidad (Marcus, *et. al*, 2000).

Las islas de patogenicidad se definen como un grupo de genes localizados en regiones particulares de los cromosomas de bacterias patógenas. Dichos genes, codifican para factores de virulencia responsables del establecimiento de interacciones específicas con el hospedero, como toxinas, adhesinas, sistemas de secreción, proteínas efectoras, chaperonas, reguladores transcripcionales, etc (Hansen-Wester y Hensel, 2001).

Las características generales de las islas de patogenicidad son:

- 1- Por lo general, presentan un contenido más bajo de G+C que el resto del cromosoma.
- 2- Contienen genes que codifican para factores de virulencia.
- 3- Están presentes sólo en los genomas de bacterias patógenas.
- 4- Frecuentemente se encuentran asociadas con genes de ARN de transferencia (tRNA).

- 5- Ocupan regiones del genoma relativamente grandes. No obstante, existen regiones pequeñas del genoma que codifican para factores de virulencia llamadas islotes.
- 6- Se encuentran flanqueadas por secuencias pequeñas directamente repetidas (DR) (Marcus, *et. al*, 2000).

Se propone que estas islas fueron adquiridas por las bacterias mediante transferencia horizontal, a partir de fagos o plásmidos provenientes de ancestros aún desconocidos (Navarre, *et. al*, 2007).

Se han identificado cinco islas de patogenicidad en *Salmonella* (SPIs, por *Salmonella Pathogenicity Islands*), que tienen diferente función en la patogénesis (Marcus, *et. al*, 2000; Gerlach, *et. al*, 2007).

La isla de patogenicidad 1 (SPI-1) es requerida para la penetración de la bacteria a las células epiteliales del intestino.

La isla de patogenicidad 2 (SPI-2) tiene un papel central en la fase sistémica de la infección por *Salmonella* y en la patogénesis intracelular. Es requerida para el crecimiento y supervivencia de la bacteria dentro del hospedero.

La isla de patogenicidad 3 (SPI-3) es requerida también para la supervivencia intracelular en macrófagos, proveyendo de productos esenciales para el crecimiento de la bacteria en condiciones limitadas de Mg^{2+} .

La isla de patogenicidad 4 (SPI-4) codifica para un sistema de secreción tipo I que regula la secreción de citotoxinas. Además, participa en la adaptación de la bacteria al ambiente intracelular en macrófagos.

Finalmente, se han identificado factores de virulencia codificados por la isla de patogenicidad 5 (SPI-5), responsables de la regulación de la inflamación de la mucosa intestinal y de la secreción de cloro.

Sistemas de secreción tipo III

Uno de los determinantes importantes de virulencia, codificados en las islas de patogenicidad, son los sistemas de secreción tipo III (SST3, por Sistema de Secreción Tipo 3) (Zhou y Galán, 2001). Estos sistemas, específicos para la liberación de factores de virulencia, son estructuras supramoleculares encontradas en una gran variedad de patógenos Gram-negativos. Se componen por un grupo de alrededor de 20 proteínas que forman una estructura similar a una aguja molecular, el inyectisoma o complejo de aguja.

Algunas de estas proteínas tienen homología con los componentes del flagelo, sugiriendo que éstas se originaron de un ancestro común (Cornelis, 2006).

El complejo de aguja consiste en una estructura cilíndrica basal, similar al cuerpo basal del flagelo, compuesto por dos pares de anillos conectados por un bastón (Fig. 3). Los anillos superiores que interactúan con la membrana externa y el peptidoglicano, se extienden a la superficie formando el inyectisoma (Cornelis y Van Gijsegem, 2000).

El ensamble secuencial y ordenado del inyectisoma procede de la siguiente manera: primero, las proteínas destinadas a formar la base del complejo se secretan a través de la membrana interna por un mecanismo *sec*-dependiente. Una vez dentro del periplasma, estas proteínas forman el complejo basal del inyectisoma, el

cual es capaz de secretar a las proteínas que forman la aguja. Una vez que la máquina supramolecular se ensambla, ésta es capaz de secretar a las proteínas efectoras del SST3, destinadas a ser liberadas dentro de la célula hospedera (Zhou y Galán, 2001).

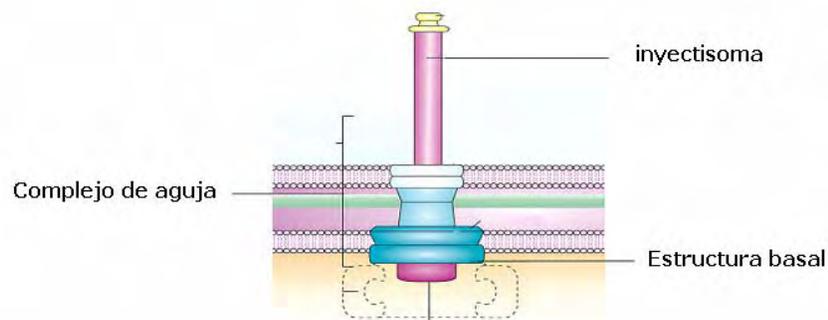


Figura 3. Estructura del complejo de aguja (Cornelis, 2006).

En *S. Typhimurium*, existen dos tipos de SST3: uno para la biogénesis flagelar y otro para la liberación de factores de virulencia.

El SST3 flagelar consiste en una estructura extracelular que tiene un crecimiento distal. Los componentes proteicos son exportados a través del canal central, hacia el extremo creciente. La biogénesis flagelar inicia con el ensamble de una estructura cilíndrica basal que se inserta en la membrana interna y forma el núcleo sobre el que se acoplarán todos los demás componentes. Posteriormente, se forma el anillo C que se localiza en el citoplasma. Una vez formado el aparato de

exportación, se secretan la flagelina y las subunidades del eje y del gancho, este último, alcanzando una longitud de 55 nm (Komoriya, *et. al*, 1999).

El flagelo y el sistema de motilidad están generalmente asociados con la vida extracelular del patógeno, siendo la motilidad indispensable para la invasión. El SST3 flagelar también posee un potencial pro-inflamatorio. La flagelina dispara la secreción de IL-8 con el fin de reclutar células fagocíticas al sitio de infección (Hautefort, *et. al*, 2007).

Además, tanto SPI-1 como SPI-2, codifican para un SST3, cuya función se requiere en diferentes estados de la patogénesis. Estos SST3 juegan un papel central en la interacción *Salmonella*-hospedero. Su función es la de translocar a las proteínas efectoras de la bacteria hacia las células hospederas. Ahí alteran las funciones celulares del hospedero, como la polimerización de actina, el tráfico membranal, señales de transducción y apoptosis.

La translocación de efectores vía el SST3 codificado por SPI-1, permite a *Salmonella* entrar a células no fagocíticas e iniciar la inflamación intestinal. En cambio, el SST3 de SPI-2 juega un papel importante en la supervivencia y replicación de la bacteria al interior de los macrófagos, estableciéndose así, una enfermedad sistémica (Fig. 4) (Zhou y Galán, 2001).

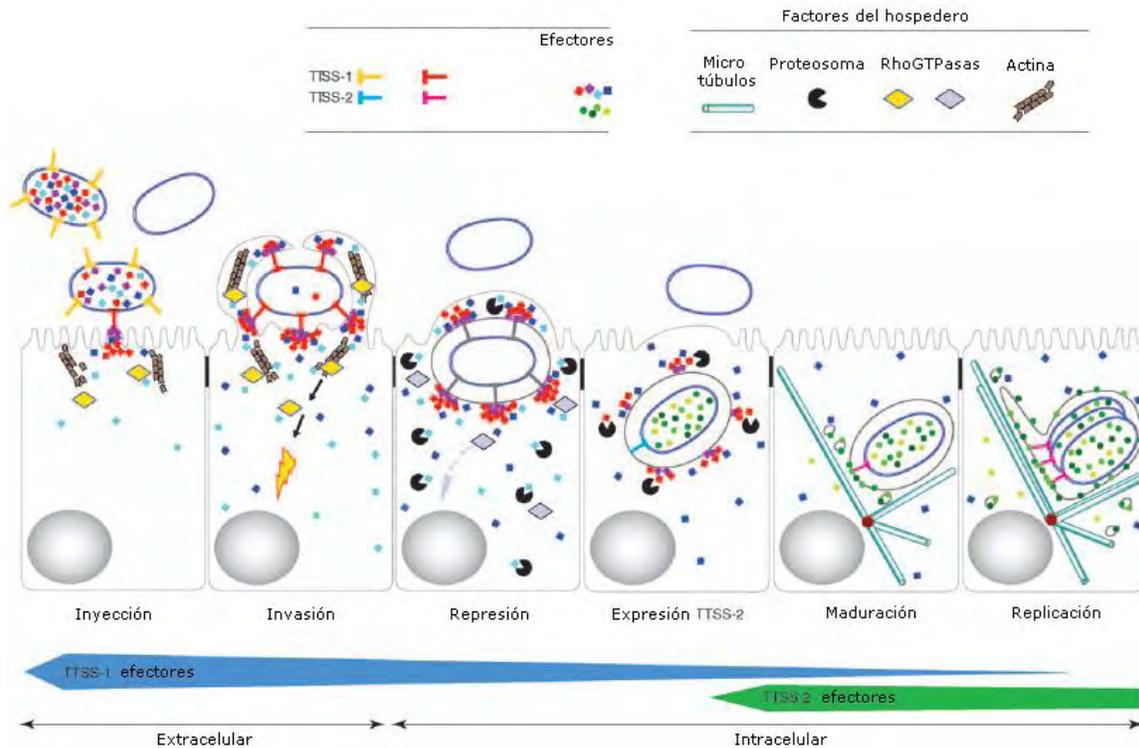


Figura 4. Translocación de efectores vía los SST3 codificados en SPI-1 y SPI-2. Se observa la regulación espacio-temporal de la concentración de proteínas efectoras durante la fase extracelular e intracelular de la infección por *Salmonella* (Schlumberger y Hardt, 2006).

SPI-1

La isla de patogenicidad 1 (SPI-1) consta de un segmento de 40kb y está localizada en el centisoma 63 del cromosoma de *S. Typhimurium*. A diferencia de otras islas de patogenicidad de *S. enterica*, SPI-1 no está localizada inmediatamente adyacente a genes *tRNA*. Se encuentra flanqueada por los genes homólogos de *E. coli fhla* y *mutS* (Marcus, *et. al*, 2000).

Tiene un porcentaje del 42% en G+C y contiene al menos 29 genes que codifican tanto para los componentes del SST3, denominados *inv-spa*, como para

sus proteínas efectoras y reguladores (Fig. 5). Sin embargo, no todos los genes de esta isla son requeridos para la función del sistema de secreción. Un grupo de cuatro genes localizados en la periferia de la isla, codifican para un sistema de captación de hierro, el cual no es requerido para la invasión (Hansen-Wester y Hensel, 2001).

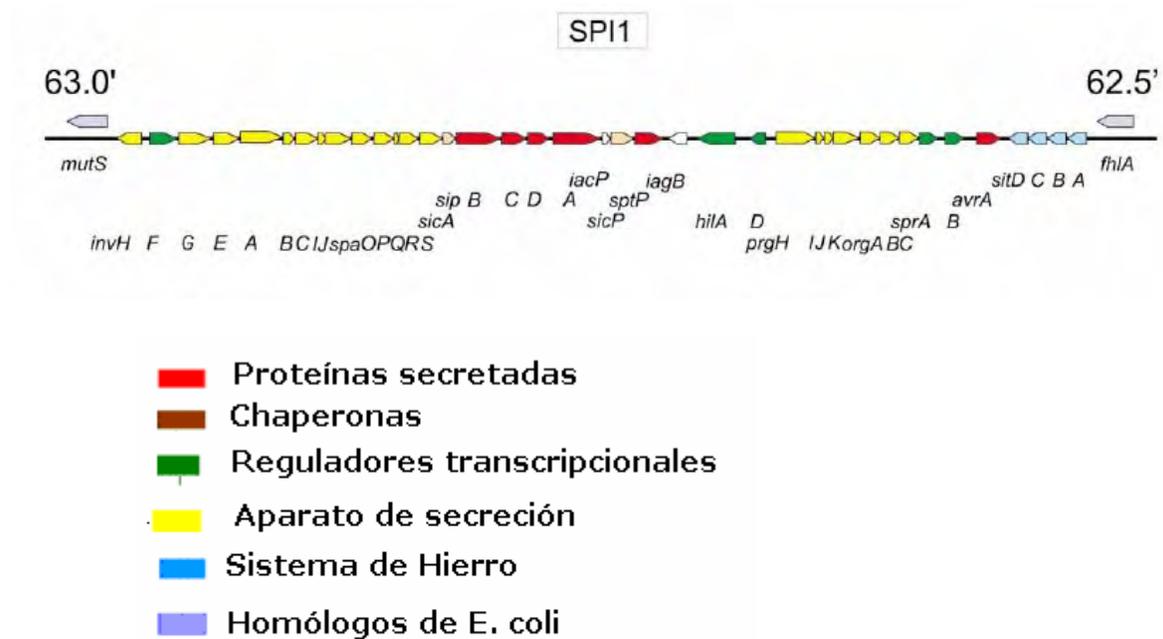


Figura 5. Organización genética de SPI-1 (Hansen-Wester y Hensel, 2001).

SPI-1 se requiere para la penetración de la bacteria a las células epiteliales del intestino (Zhou y Galán, 2001).

La translocación de efectores, vía el SST3 codificado por SPI-1, permite a *Salmonella* entrar a células no fagocíticas, como las células M del epitelio intestinal (Marcus, *et. al*, 2000).

La invasión de la célula hospedera resulta de la acción coordinada de al menos cinco proteínas efectoras.

SopE, codificada por un profago críptico tipo P2; SopE2, codificada dentro de SPI-1 y SopB/SigD, codificada dentro de SPI-5, inducen los rearrreglos del citoesqueleto de actina al activar a dos GTPasas de la familia Rho: CDC42 y Rac (Fig. 6) (Patel y Galán, 2006).

La activación de estas proteínas dispara una serie de eventos de señalización que derivan en los rearrreglos del citoesqueleto de actina y en la producción de citocinas proinflamatorias.

SopE2 activa a CDC42 y SopE puede activar tanto a CDC42 como a Rac. Estas proteínas efectoras mimetizan la función de GEF (Guanine Exchange Factor).

CDC42 actúa con la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) para activar al complejo Arp2/3. Este último, inicia la polimerización y ramificación de los filamentos de actina. De esta forma, se induce el “*ruffling*” de la membrana para permitir la internalización de *Salmonella* (Patel y Galán, 2005).

SopB/SigD tiene actividad de inositol fosfato fosfatasa, por lo que genera una gran cantidad de fosfolípidos de inositol e inositol fosfato con capacidad de señalización.

Participa en los rearrreglos del citoesqueleto al activar también a las GTPasas CDC42 y Rac (Fig. 6). Además, contribuye con los síntomas de la diarrea, al verse involucrada en la secreción de la fase fluida y estimular la secreción de cloro (Marcus, *et. al*, 2002).

Se ha visto, que esta proteína también es un factor importante para el establecimiento y replicación intracelular de *Salmonella*, pues promueve la formación del fagosoma y evade la unión de éste con los lisosomas.

SptP es una proteína con actividad de fosfotirosina fosfatasa que se comporta como GAP (GTPase Activating Protein). Inactiva a las GTPasas CDC42 y a Rac, para revertir la acción de SopB, SopE y SopE2 (Fig. 6). De esta manera, ayuda a la célula hospedera a restaurar su citoesqueleto de actina (Patel y Galán, 2005).

La entrada de *Salmonella* también requiere de la función de dos proteínas de unión a actina secretadas por el SST3 de SPI-1: SipA y SipC (Fig. 6).

SipA modula el proceso de internalización de *Salmonella* al inhibir la despolimerización de F-actina y activar T-plasmina (Fig. 6). Aumenta la polimerización de actina (Schulmberger y Hardt, 2006).

SipC es requerida para la translocación de moléculas efectoras dentro de la célula hospedera. Además, participa en la nucleación y empaquetamiento de actina (Patel y Galán, 2005).

Las proteínas SipB, SipC y SipD son requeridas para la translocación de proteínas efectoras dentro del citoplasma de la célula hospedero. Son las

responsables de formar poros en la membrana de las células eucariontes (translocón) (Raffatellu, *et. al*, 2005).

SipB es también capaz de inducir apoptosis de macrófagos al asociarse con la caspasa-1 y disparar la activación de las citocinas proinflamatorias IL-1B e IL-18 (Fig. 6) (Patel y Galán, 2005).

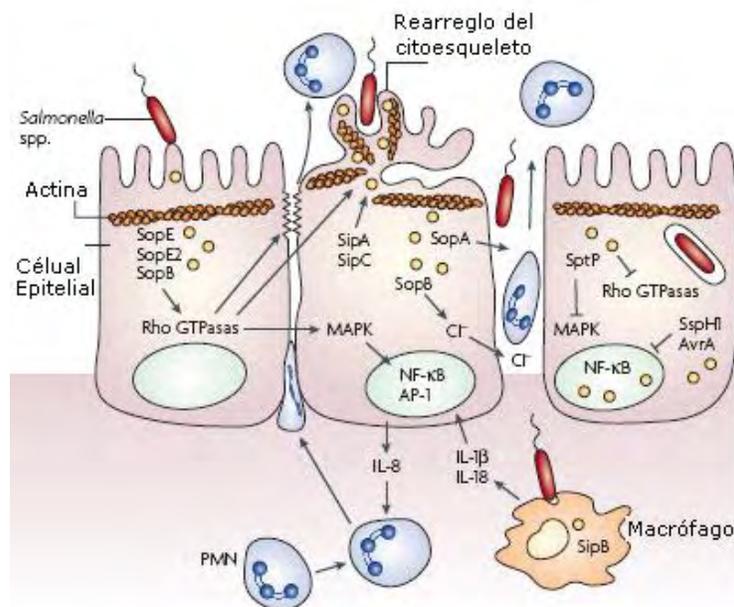


Figura 6. La invasión de la célula hospedera por *Salmonella* resulta de la acción coordinada de las proteínas efectoras del T3SS de SPI-1 (Haraga, *et. al*, 2008).

SPI-2

SPI-2 consta de un segmento de 40kb, el cual cuenta con más de 40 genes. Se localiza en el centisoma 31 del cromosoma de *S. Typhimurium*. No obstante, sólo

una porción de 25kb, situada entre los genes tRNA *valV* y ORF242 es requerida para la patogénesis sistémica (Hansen-Wester y Hensel, 2001).

Se han descrito cuatro tipos de genes de virulencia en esta región agrupados en cuatro operones: *ssa*, integrado por genes que codifican para proteínas que forman parte del SST3; *ssrAB*, integrado por genes que codifican para el sistema de regulación de dos componentes SsrA/B; *ssc*, integrado por genes que codifican para chaperonas y, por último, el operón *sse*, integrado por genes que codifican para proteínas efectoras.

Una porción pequeña, de aproximadamente 14.5kb (Fig. 7), le permite a *Salmonella* utilizar el tetrionato como aceptor de electrones para la respiración bajo condiciones anaerobias (Hensel, 2000).

Se ha visto, que los dos segmentos de SPI-2 podrían haber sido adquiridos en diferentes eventos de transferencia horizontal por *S. Typhimurium*. Debido a que especies filogenéticamente más viejas, como *S. bongori*, presentan la región de 14.5kb, se dedujo que esta región se adquirió primero en el tiempo (Marcus, *et. al*, 2000).

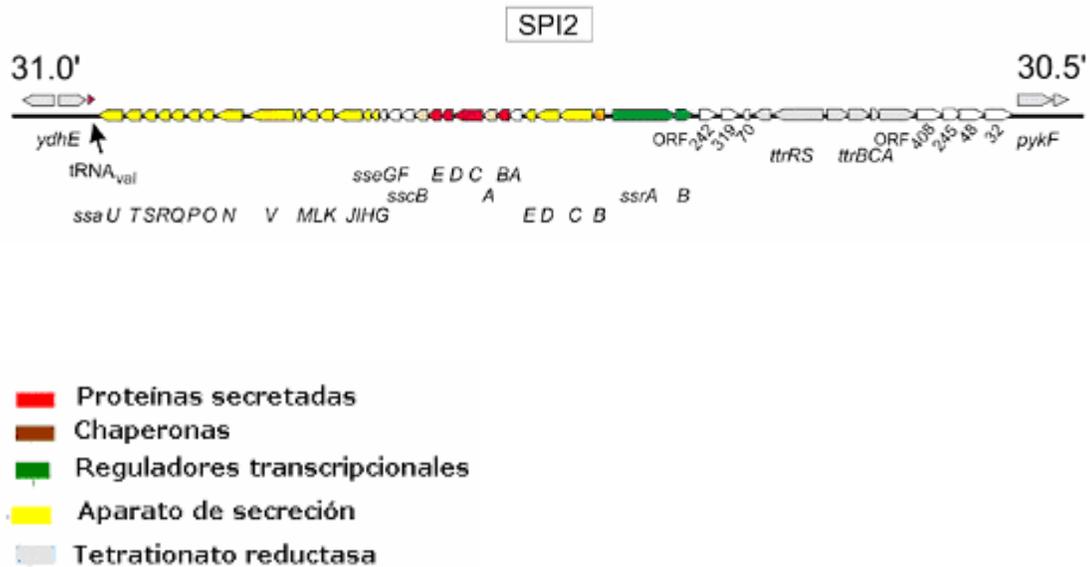


Figura 7. Organización genética de SPI-2 (Hansen-Wester y Hensel, 2001).

Los genes de SPI-2 se requieren para el establecimiento de la infección sistémica. Las proteínas efectoras translocadas por el SST3 afectan el desarrollo normal de las SCV. Además, promueven la replicación intracelular al interferir con el tráfico vesicular del hospedero (Duong, *et. al*, 2007).

Éstas proteínas actúan cooperativamente para retardar la maduración de fagosomas a fagolisosomas, e interferir la localización de NADPH oxidasa y de óxido nítrico sintetasa (iNOS) en las SCV. De esta manera, evaden las defensas de la célula hospedero (Waterman y Holden, 2003).

La proteína efectora SsaB (SpiC) interfiere con el tráfico intracelular de membranas, ya que inhibe la fusión de las vacuolas fagosomales con los lisosomas (Waterman y Holden, 2003).

El operón *sse* está representado por los genes *sseA-sseG*. La expresión de éste, permite a la bacteria invadir células no fagocíticas, inhibir la fagocitosis, inducir apoptosis y modular las vías de señalización.

SseB es secretada a la superficie bacteriana y es necesaria para prevenir la localización de NADPH oxidasa y la formación de radicales reactivos del oxígeno, en la membrana del fagosoma de macrófagos murinos (Haraga, *et. al*, 2008).

SseC es una proteína formadora del poro requerida para la translocación. Esto sugiere, que dentro del citoplasma celular, *Salmonella* libera proteínas dentro de la vacuola fagosomal.

Las proteínas SifA, SseF, SseG, SopD2, PipB y PipB2 son requeridas para la formación de filamentos de membrana (Sifs), los cuales se originan desde la vacuola fagosomal, extendiéndose a través de la célula (Fig. 8) (Waterman y Holden, 2003; Knodler, *et. al*, 2003).

La función de estos filamentos es la de incrementar el tamaño de las SCV, para facilitar la replicación de la bacteria durante la infección sistémica (Hensel, 2000).

SifA está codificada en un islote de patogenicidad. Esta proteína, además de intervenir con la formación de los filamentos de membrana, mantiene la integridad membranal de las vacuolas fagosomales. Esto lo logra al inhibir la asociación de la vacuola fagosomal con la proteína motora quinesina, y al controlar el reclutamiento de dineina (García del Portillo, 2001; Haraga, *et. al*, 2008).

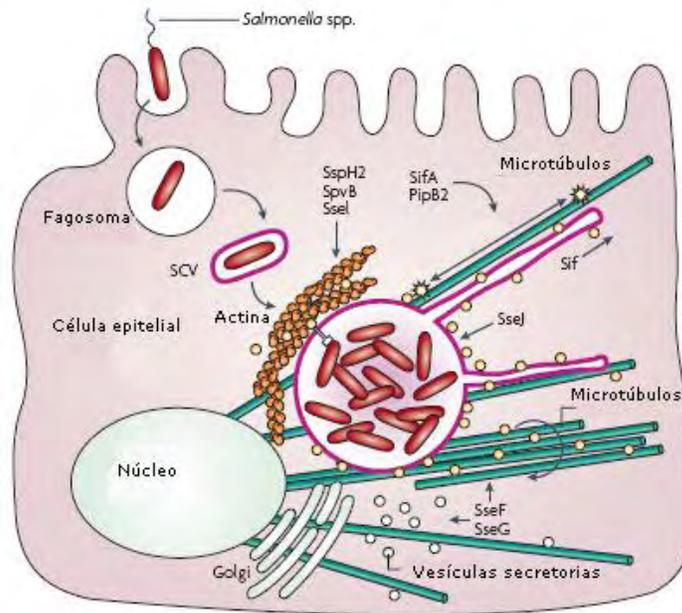


Figura 8. Las proteínas efectoras, translocadas por el SST3 de SPI-2, promueven la replicación intracelular al interferir con el tráfico vesicular del hospedero (Haraga, *et. al*, 2008).

Factores ambientales que inducen la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2

Las bacterias se tienen que adaptar a cambios ambientales drásticos cuando entran al hospedero, al viajar a lo largo del aparato digestivo y, por último, cuando pasan de un medio extracelular a uno intracelular.

La adaptación de *Salmonella* implica, por una parte, el reconocimiento de ciertas señales captadas del medio externo y, por otra, la elaboración de una respuesta que generalmente se encuentra relacionada con una regulación coordinada y precisa de sus genes.

Las condiciones ambientales encontradas por *Salmonella* en el intestino, promueven la expresión de los genes de SPI-1, los cuales se requieren para la invasión de células de la superficie intestinal.

Condiciones ambientales con bajas concentraciones de oxígeno y alta osmolaridad, representan una señal para la expresión de los genes de SPI-1 (Fig. 9). Esto es porque el lumen del intestino es anaeróbico, con una osmolaridad por arriba de 300mOsm (Jones, 2005; Altier, 2005).

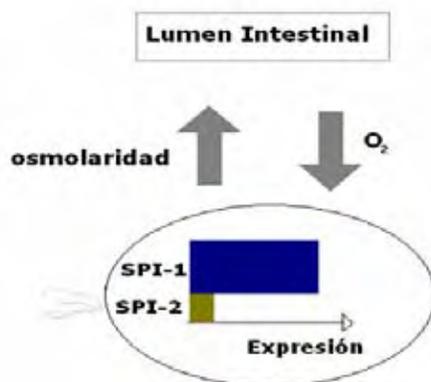


Figura 9. La expresión de SPI-1 es regulada en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno y alta osmolaridad (Hansen-Wester y Hensel, 2001).

Además, la concentración de acetato en el intestino delgado (15-30mM) favorece la expresión de los genes de SPI-1.

La bilis, secretada en la porción proximal del intestino delgado, así como el propionato y el butirato, presentes en el ciego y en el colon, son factores que reprimen la expresión de los genes de SPI-1 (Altier, 2005).

In vitro, la expresión de los genes de SPI-1 se induce cuando se crece a *Salmonella* en el medio de cultivo rico en nutrientes Luria-Bertani (LB) y a 37°C, por lo que se piensa que estas condiciones de crecimiento asemejan a las condiciones que *Salmonella* encuentra en el lumen intestinal. (Papezova, *et. al*, 2007; Ellermeier y Slauch, 2008).

Los factores ambientales que inducen la expresión de los genes de SPI-2, son: concentraciones bajas de magnesio, calcio y fosfato; un pH ácido; baja osmolaridad y presencia de péptidos antimicrobianos (Fig. 10). Se propone que estas señales son las que encuentra *Salmonella* cuando está dentro de las células hospederas (Hensel, 2000; García-del Portillo, 2001; Bader, *et. al*, 2003).

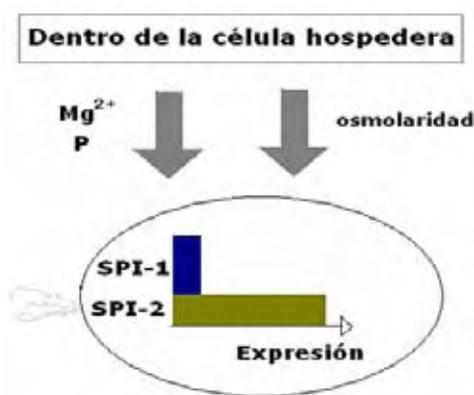


Figura 10. La expresión de SPI-2 es regulada en respuesta a bajas concentraciones de magnesio y fosfato, así como a una osmolaridad alta (Hansen-Wester y Hensel, 2001).

Varios estudios han indicado que tanto el pH como los péptidos antimicrobianos, son condiciones esenciales del ambiente fagosomal. (Hensel, 2000).

Los genes de SPI-2 se expresan *in vitro* cuando se crece a *Salmonella* en un medio de cultivo mínimo, con bajas concentraciones de magnesio y fosfato (Hensel, 2000; Hansen-Wester y Hensel, 2001).

Sin embargo, el grupo del Dr. José Luis Puente observó que, al igual que los genes de SPI-1, los genes de SPI-2 también se expresan cuando se crece a *Salmonella* en medio LB. Aunque, mientras que los genes de SPI-1 se expresan al final de la fase exponencial de crecimiento, los genes de SPI-2 se expresan en una etapa tardía de la fase estacionaria de crecimiento (Bustamante *et al*, sometido). Estos resultados apoyan estudios recientes que indican que los genes de SPI-2 también son importantes para la infección intestinal (Bispham, *et. al*, 2001; Coburn, *et. al*, 2005; Coombes, *et. al*, 2005; Jones, *et. al*, 2007). Además, se ha reportado que los genes de SPI-2 se expresan en el lumen intestinal, antes de la invasión a las células del epitelio intestinal (Brown, *et. al*, 2005).

Mecanismo molecular que regula la expresión de los genes de SPI-1

Los reguladores transcripcionales codificados dentro de SPI-1, generan una compleja cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1, así como de otros genes que se requieren para la invasión y que están localizados en otras regiones del cromosoma de *Salmonella* (Ellermeier, *et. al*, 2005).

hilA es un gen que codifica para la proteína reguladora HilA, la cual pertenece a la familia de reguladores transcripcionales OmpR/ToxR.

HilA se une a los promotores de los operones *prg/org* e *inv/spa* para promover su transcripción (Boddicker, *et. al*, 2003). El primer gen del operón *inv/spa* codifica para InvF, el cual pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC (Fig. 11). Este regulador induce la expresión de los operones *sip/sic*, así como de los genes *sopB/sigD* y *sopE*, codificados fuera de SPI-1 (Ellermeier, *et. al*, 2005).

La expresión de *hilA* está controlada por un circuito de regulación que involucra algunos reguladores codificados en SPI-1, como son: HilD y HilC, así como RtsA, codificado fuera de SPI-1. Estas tres proteínas son miembros de la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS y cada una es capaz de activar la expresión de *hilD*, *hilC* y *rtsA*, generando una compleja cascada de regulación que controla la expresión de *hilA*. (Ellermeier y Slauch, 2008). HilD y HilC, además de controlar su propia expresión, pueden inducir también la expresión de *invF* por una vía independiente de *hilA*.

HilD se une a las regiones corriente arriba del promotor de *hilA*, localizadas entre las posiciones -179 a -231 y -49 a -101 con respecto al inicio de la transcripción de *hilA* (Jones, 2005). Este regulador induce la expresión de *hilA*, principalmente al contrarrestar la represión que ejerce el regulador H-NS sobre el promotor de este gen (Fig. 11) (Schechter y Lee, 2001; Olekhovich y Kadner, 2006).

El papel de HilC y RtsA en la expresión de *hilA* no es muy claro, ya que en mutantes en *hilC* o *rtsA* sólo se afecta muy ligeramente la expresión de *hilA* y de sus genes regulados de SPI-1 (Altier, *et. al*, 2000 y Ellermeier y Slauch, 2008). Sin embargo, cuando se sobre-expresan estos reguladores, se incrementa la expresión de los genes de SPI-1 (Altier, *et. al*, 2000; Altier, 2005). También, se ha visto que la sobre-expresión de HilC o RtsA restaura la expresión de *hilA* y de los genes de SPI-1 en una mutante *hilD* (Oleknovich y Kadner, 2007).

Además de los reguladores mencionados, se han identificado reguladores globales codificados fuera de SPI-1, que regulan la expresión de *hilD* o *hilA*. Entre estos reguladores, se encuentran los sistemas de dos componentes PhoP/Q, BarA/SirA y EnvZ/OmpR (Ellermeier, *et. al*, 2005).

PhoP/Q, el cual responde principalmente a concentraciones de magnesio, reprime a *hilA*, mientras que los sistemas BarA/SirA y EnvZ/OmpR, modulan positivamente la expresión de *hilA*, a través de HilD (Fig. 11).

Así mismo, los reguladores Csr, Fis, FliZ, HU, FadD y CpxA, regulan positivamente la expresión de *hilD* o *hilA* (Altier, 2005; Ellermeier, *et. al*, 2005).

Por el contrario, los reguladores HilE, FimZY y la proteasa Lon se han identificado como reguladores negativos de la expresión de *hilD* o *hilA* (Baxter, *et. al*, 2003; Boddicker, *et. al*, 2003; Baxter y Jones, 2005; Dongxia, *et. al*, 2007 y Ellermeier y Slauch 2008).

La proteasa Lon degrada a HilD, mientras que la proteína HilE interactúa con HilD para inhibir su actividad y así reprimir la expresión de *hilA*.

FimZY, al controlar la expresión de *hilE*, reprime la expresión de *hilA*.

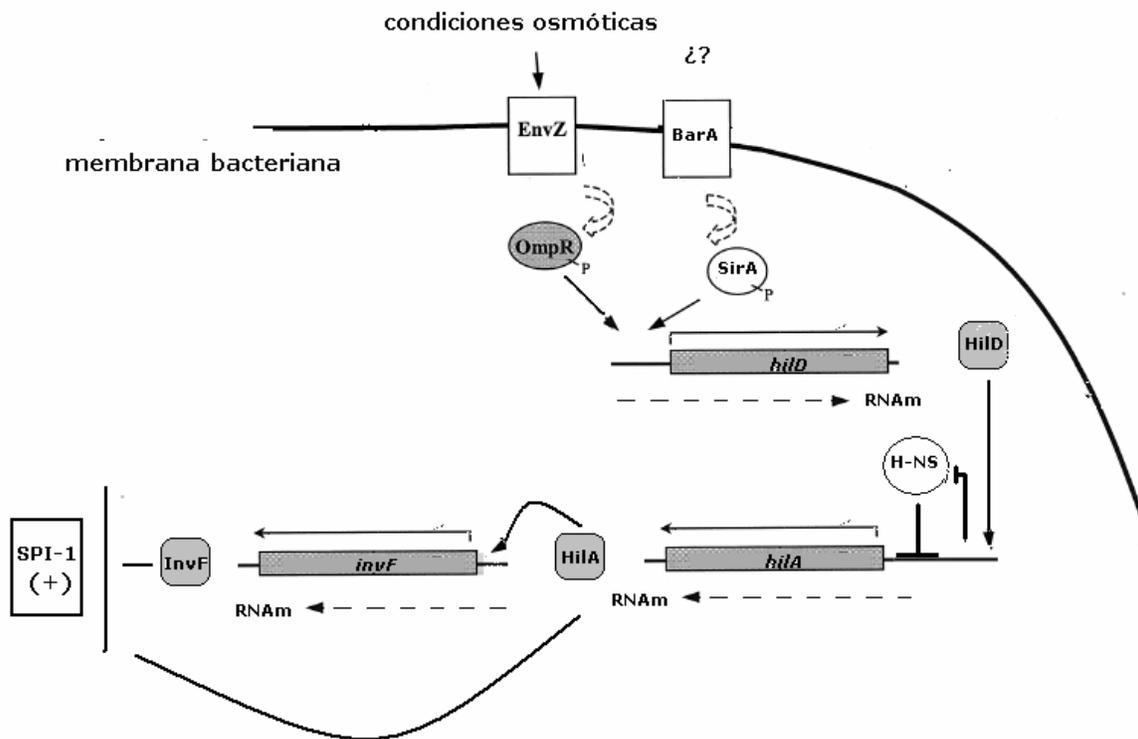


Figura 11. Modelo de la regulación transcripcional de los genes de SPI-1

Mecanismo molecular que regula la expresión de los genes de SPI-2

SPI-2 contiene un sistema de regulación local que fue adquirido por transferencia horizontal junto con los genes estructurales. Sin embargo, la expresión de los genes de SPI-2 también es modulada por sistemas de regulación globales, codificados por genes que se encuentran fuera de SPI-2.

El sistema de dos componentes SsrA/B, codificado en SPI-2, es autorregulado. Controla positivamente la expresión de los genes de SPI-2, así como de genes que se requieren para la supervivencia intracelular y que están

localizados en otras regiones del cromosoma de *Salmonella* (Duong, *et. al*, 2007; Walthers, *et. al*, 2007).

A su vez, la expresión del operón *ssrAB* es regulada positivamente por los sistemas de dos componentes PhoP/PhoQ y EnvZ/OmpR, así como por las proteínas SlyA y Fis (Lee, *et. al*, 2000; Feng, *et. al*, 2003 y Walthers, *et. al*, 2007).

El sistema de dos componentes PhoP/PhoQ regula la expresión de *ssrAB* en respuesta a condiciones de crecimiento con bajas concentraciones de magnesio y pH ácido (Bader, *et. al*, 2003). PhoP actúa como un “switch” molecular, pues mientras que reprime a los genes de virulencia necesarios para la invasión de células epiteliales, induce la expresión de los genes requeridos para la supervivencia de *Salmonella* dentro de los macrófagos (Bader, *et. al*, 2003).

La proteína cinasa EnvZ, al detectar un pH bajo y una disminución en la osmolaridad dentro de la vacuola, fosforila al regulador transcripcional OmpR, el cual se une a la región promotora de *ssrA/B* para inducir su expresión (Fig. 12) (Lee *et al*, 2000).

La proteína cinasa SsrA funciona como el segundo detector de señales tardías del compartimiento vacuolar, probablemente detectando la disminución de fosfato; SsrA fosforila a SsrB, el cual induce directamente la transcripción de los genes *sse*, *ssc* y *ssa* (Fig. 12).

La colaboración entre los distintos sistemas de regulación de dos componentes, es indispensable para detectar las señales del ambiente intracelular. Además, le permite a la bacteria responder inmediatamente ante los cambios

ambientales, encendiendo los genes necesarios para evadir los mecanismos de defensa del hospedero.

YdgT es una proteína semejante a histonas que funciona como regulador negativo de la expresión de SPI-2 (Walthers, *et. al*, 2007).

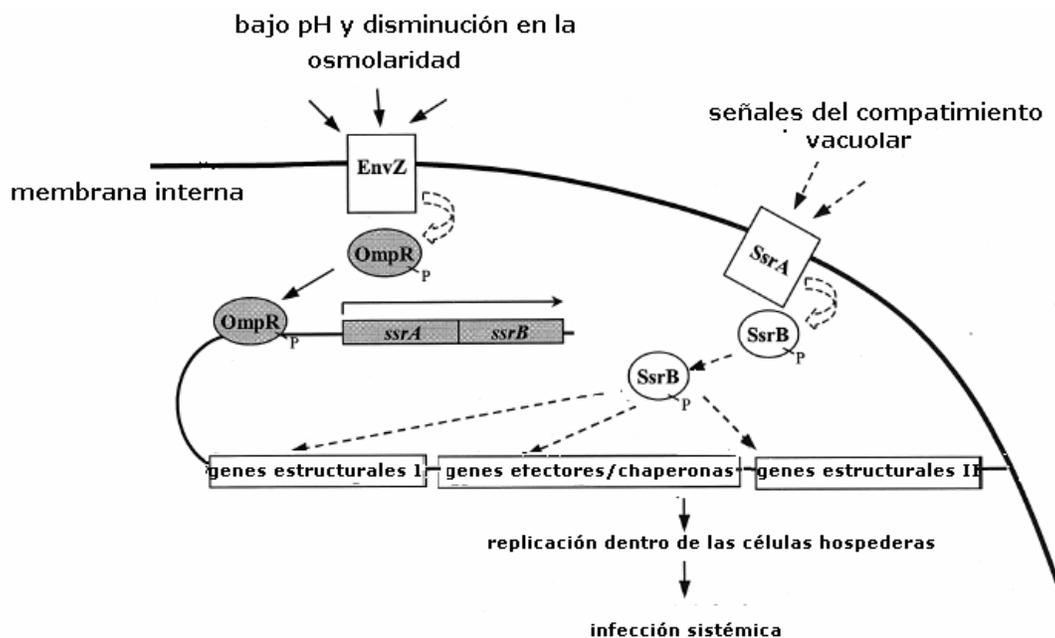


Figura 12. Modelo de la regulación transcripcional de los genes de SPI-2 dentro de los macrófagos del hospedero (Lee *et al*, 2000).

H-NS, StpA y Hha

Las proteínas asociadas al nucleóide se unen a los ácidos nucleicos (generalmente al ADN). Son proteínas básicas con un peso molecular bajo. Generalmente se refiere a ellas como proteínas asociadas a histonas, pues tienen una similitud funcional con las histonas de las células eucarióticas.

H-NS, StpA y Hha son proteínas de bajo peso molecular, aproximadamente de 15kDa y 137 aminoácidos, de 15kDa y 133 aminoácidos y de 8kDa y 72 aminoácidos, respectivamente. Se encuentran localizadas por todo el nucleóide bacteriano y juegan un papel importante en la organización de este, ya que son capaces de reconocer e interaccionar con regiones curvadas del ADN para compactarlo dentro de la célula (Dorman, 2006; Olekhnovich y Kadner, 2007 y De la Cruz, *et. al*, 2007).

Además, son consideradas como reguladores globales de la transcripción, pues controlan la expresión aproximadamente del 5% de los genes de *E. coli*. Están implicadas en la regulación de la expresión de factores de virulencia de cepas enteropatógenas. Por ejemplo, Hha regula la expresión de los operones α -hemolisina y *esp* en *E. coli* y está involucrada en la termo y osmo-regulación negativa de genes de virulencia en bacterias Gram-negativas (Vivero, *et. al*, 2007).

Genes, ya sean controlados directa o indirectamente por H-NS, StpA o Hha, están involucrados en el proceso de adaptación de la bacteria durante los cambios de las condiciones ambientales (Stella, *et. al*, 2006).

Las tres proteínas se encuentran principalmente como heterodímeros. StpA se encuentra predominantemente formando el complejo H-NS/StpA, aunque H-NS puede existir también como homodímero (Dorman, 2004; Navarre, *et. al*, 2007).

Hha puede formar parte tanto del complejo represivo H-NS/Hha, como del complejo Hha/YdgT, para modular la expresión génica (Olekhnovich y Kadner, 2007; Silphaduang, *et. al*, 2007). En mutantes *hha*, la expresión de *ydgT* se encuentra significativamente incrementada. Cuando la proteína YdgT se encuentra

sobre-expresada tiene la capacidad de complementar algunos fenotipos en una mutante *hha* (Vivero, *et. al*, 2007).

La producción de H-NS está ligada al ciclo celular. Existe una correlación positiva entre la transcripción de *hns* y la síntesis de ADN. Este mecanismo de regulación mantiene un nivel constante de concentración de H-NS en la célula. En condiciones de laboratorio, este nivel constante se mantiene durante el crecimiento de la bacteria en medio Luria-Bertani (LB) a 37°C (Dorman, 2004).

Al crecer la bacteria en un medio rico, StpA presenta bajos niveles de expresión, lo que se traduce en 200 copias por célula. Por el contrario, en un medio mínimo y bajo condiciones de estrés, sus niveles incrementan. Por ello, se encuentra fuertemente inducida en condiciones de estrés osmótico, aumento de temperatura y crecimiento en un medio mínimo (Müller, *et. al*, 2006).

El gen *hha* presenta niveles de transcripción y expresión más elevados en fase exponencial y decrece cuando las células llegan a fase estacionaria, a diferencia de lo que ocurre con *hns*. No obstante, la sobre-expresión de *hha* reduce la invasión a células epiteliales y elimina la habilidad de *Salmonella* para invadir y destruir las placas de Peyer (Jones, 2005).

La proteína H-NS tiene un dominio N-terminal y un puente flexible, responsables éstos de su capacidad de oligomerización (Fig. 13). Mientras que su dominio C-terminal es el responsable de la capacidad de dicha proteína para unirse al ADN (Dorman, 2004; Rimsy, 2004; Stella, *et. al* 2005 y Dorman, 2007).



Figura 13. Representación esquemática de la estructura de la proteína H-NS. Una estructura similar ha sido propuesta para StpA (Dorman, 2004).

La proteína StpA es paróloga de H-NS, pues posee un 58% de identidad y un 67% de similitud a nivel de secuencia (Navarre, *et. al*, 2007). Sin embargo, puede unirse al ADN con una mayor afinidad que H-NS (Müller, *et. al*, 2006 y De la Cruz, *et. al*, 2007).

StpA y H-NS se autorregulan y a la par mantienen una regulación cruzada, lo que les permite conservar una concentración adecuada. En mutantes *hns*, las cuales presentan alteraciones en el superenrollamiento del ADN, así como en la regulación de la expresión génica, la expresión de *stpA* se encuentra significativamente incrementada. Cuando la proteína StpA se sobre-expresa, tiene la capacidad de complementar algunos fenotipos de una mutante *hns*. Por el contrario, una mutación en *stpA* no tiene un fenotipo determinado (Dorman, 2004; Müller, *et. al*, 2006 y Navarre, *et. al*, 2007).

III. ANTECEDENTES

Recientemente se propuso que H-NS tiene un papel esencial en la regulación de las islas de patogenicidad transferidas horizontalmente. La habilidad de H-NS para interaccionar a través de todo el ADN, radica en que reconoce estructuras en el ADN, más que una secuencia consenso. Esta estructura se caracteriza por ser una región curvada del ADN, generalmente más rica en A-T que el resto del genoma y que puede estar asociada a los promotores (Dorman, 2006 y Bouffartigues, *et. al*, 2007).

En el genoma de *S. Typhimurium*, H-NS se une a los genes de las islas de patogenicidad. Particularmente, se reportó que H-NS interacciona y reprime la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 (Navarre, *et. al*, 2007 y Walthers, *et. al*, 2007). H-NS reprime la expresión de los genes de virulencia que han sido adquiridos por transferencia horizontal.

Por lo tanto, H-NS tiene una función protectora hacia la célula. Silencia la expresión de las secuencias adquiridas horizontalmente por la bacteria, permitiendo que los genes de virulencia se incorporen al genoma en un estado inerte. Gracias a esto, se evaden los efectos negativos en la fisiología de la célula, a la vez que se facilita la adquisición de los genes de virulencia a través del tiempo.

La oligomerización de H-NS es esencial para el reconocimiento de regiones curvadas del ADN, así como para su actividad biológica (Stella, *et. al*, 2005).

La proteína forma sitios de nucleación a través de secuencias ricas en A-T dentro de los promotores, siendo esto indispensable para su función represora (Fig. 14). Además, puede formar complejos multiproteicos para silenciar la expresión génica (Navarre, *et. al*, 2007).

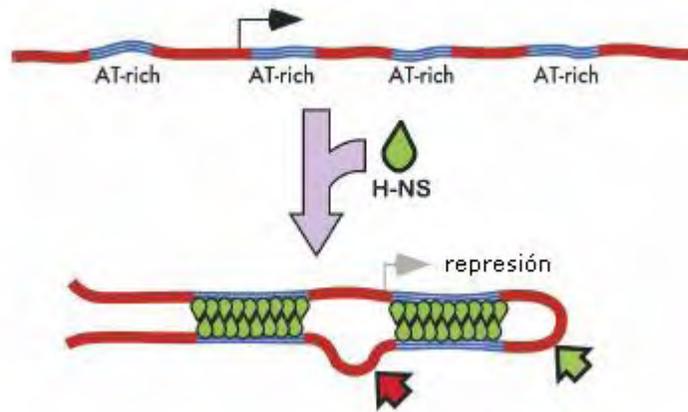


Figura 14. H-NS es capaz de oligomerizar o multimerizar en superficies de unión diametralmente opuestas, uniendo así cadenas adyacentes. De esta manera, se puede explicar su preferencia por regiones curvadas de ADN o su alta afinidad por regiones ricas en A-T; su habilidad para mantener el superenrollamiento del ADN; su requerimiento de oligomerización para curvar al ADN que no está intrínsecamente curvado y su habilidad de reprimir genes al unirse a regiones río abajo del sitio de inicio de la transcripción (Navarre *et al*, 2007).

Las señales físicas, como son la temperatura y la osmolaridad, influyen en la eficiencia de oligomerización de H-NS. De esta forma, modulan la función de H-NS en la arquitectura del nucleóide y en la regulación transcripcional de genes de

virulencia de *S. Typhimurium*, que se sabe, son reprimidos por H-NS (Stella, *et. al*, 2006).

H-NS reprime la expresión de los genes de SPI-1 al interactuar con la región reguladora de *hilA*, lo cual ocasiona que la RNA polimerasa no pueda iniciar eficientemente la transcripción del promotor (Olekhovich y Kadner, 2007).

La formación de sitios de nucleación por H-NS que, atrapa a la RNA polimerasa en el promotor, es estimulada por la existencia de regiones curvadas de ADN en el promotor de *hilA* (Fig. 15).

Sin embargo, no se sabe si H-NS también reprime directamente la expresión de los otros genes de SPI-1 o si tiene un efecto indirecto, a través de reprimir la expresión e *hilA*.

Para SPI-2, se sabe que H-NS reprime directamente la expresión del operón *ssrA/B* en la fase exponencial de crecimiento de la bacteria, en medio LB. (Fig. 15) (Duong *et al*, 2007).

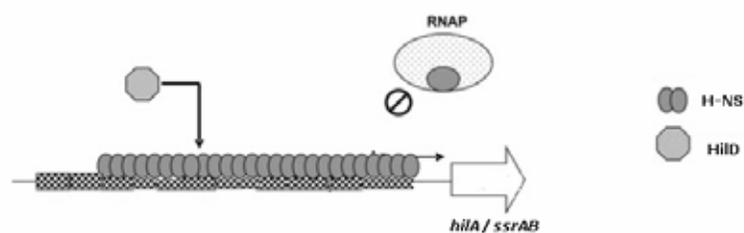


Figura 15. Modelo de la expresión de los genes *hilA* o *ssrAB* de *S. Typhimurium*. Se observa la formación de sitios de nucleación por H-NS que impide la unión de la RNA polimerasa.

Para que la bacteria pueda inducir la expresión de los genes reprimidos por H-NS, éstos deben integrarse a la cascada de regulación preexistente en la célula. Durante la evolución de la patogénesis de *Salmonella*, los reguladores locales de las islas de patogenicidad fueron incluidos a la cascada de regulación global (Fig. 16).

Los reguladores positivos, al momento de ser transferidos a una célula que expresa H-NS, pueden tomar el papel de des-represores incidentalmente. Por ejemplo, SPI-1 y SPI-2 codifican para proteínas que liberan la represión por H-NS. Se ha postulado que HilD actúa como des-represor de *hila* y *ssrA/B* al contrarrestar el efecto negativo de H-NS y no como un activador clásico de la transcripción (Olekhovich y Kadner, 2007; Bustamante, *et. al.*, no publicado).

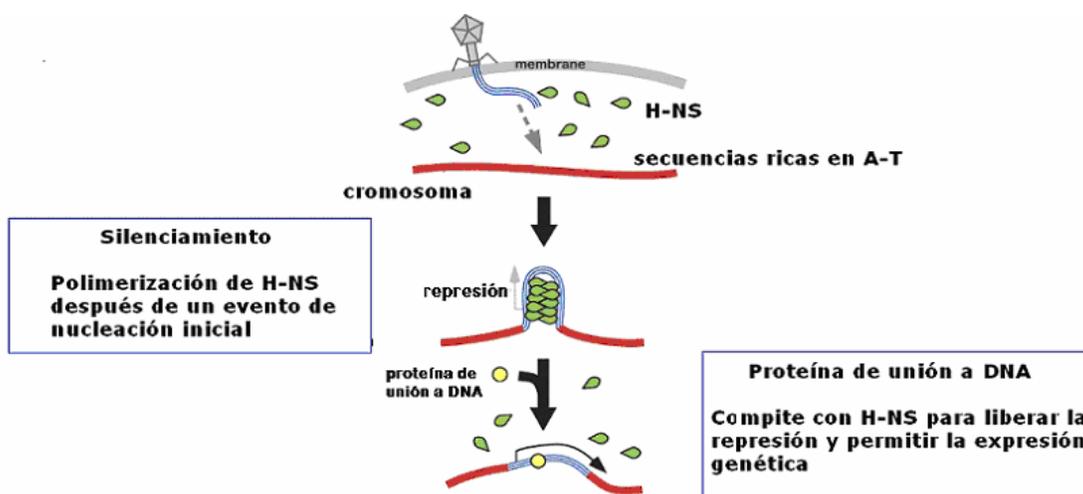


Figura 16. Las secuencias adquiridas por la célula generalmente llevan consigo tanto a los genes estructurales, como a sus reguladores. Los reguladores positivos al momento de ser transferidos a una célula que expresa H-NS, pueden tomar el papel de des-represores incidentalmente. Esto sucede

porque al interactuar los reguladores con su sitio de unión al ADN, éstos ejercen una deformación en la topología del ADN. Como resultado, ocurre la liberación de H-NS, debido a que esta proteína presenta una menor afinidad por el ADN (Navarre, *et. al*, 2007).

Además, se ha reportado que Hha regula negativamente el fenotipo de invasión de *Salmonella*, debido a que es capaz de unirse al promotor de *hilA* y reprimir su expresión (Fahlen, *et. al*, 2001). Sin embargo, Hha no siempre actúa sola. Esta proteína puede formar parte del complejo represivo, H-NS/Hha, capaz de regular la expresión de SPI-1 (Olekhnovich y Kadner, 2007).

Se sabe también, que esta proteína reprime directamente a los genes *hilC* y *rtsA* (Fig. 17). Aunque queda por saber si Hha también reprime directamente la expresión de los otros genes de SPI-1, o si tiene un efecto indirecto, a través de reprimir la expresión de *hilA* (Fahlen, *et. al*, 2001; Olekhnovich y Kadner, 2007).

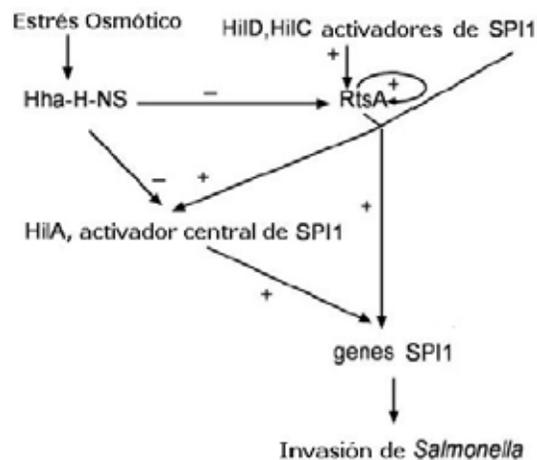


Figura 17. Modelo de la osmorregulación de SPI-1 por las proteínas asociadas al nucleóide H-NS/Hha. (Olekhnovich y Kadner, 2007).

Además de controlar el fenotipo de invasión de *Salmonella*, Hha juega un papel importante en la represión de los genes de SPI-2. En tal caso Hha se encuentra formando el complejo Hha/YdgT (Silphaduang, *et. al*, 2007).

Este complejo reprime al sistema de regulación de dos componentes SsrA/B, requerido para la expresión de los operones de SPI-2 (Vivero, *et. al*, 2007).

Un grupo significativo de genes que son reprimidos por H-NS, también son silenciados por el complejo Hha/YdgT. Esto se debe a que HHa y YdgT forman complejos heteroméricos con H-NS para favorecer la represión (Duong, *et. al*, 2007). El 87% de los genes de SPI-1 que son reprimidos por Hha/YdgT, contienen también sitios de unión para H-NS.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

- Definir el mecanismo molecular por el cual la proteína H-NS reprime la transcripción de los genes de virulencia en *Salmonella Typhimurium*.

Objetivo particular

- Definir el mecanismo molecular por el cual la proteína H-NS reprime la transcripción de los genes de los regulones SPI-1 y SPI-2.

Objetivos específicos

- Definir si H-NS actúa directamente sobre los genes *sirA*, *hilD*, *hilA*, *invF* y *sigD* del regulón SPI-1 y los genes *ssrAB*, *ssaG* y *pipB* del regulón SPI-2.
- Determinar si los reguladores SirA, HilD, HilA e InvF de SPI-1 actúan como des-represores de H-NS o como activadores clásicos de la transcripción sobre sus genes blanco.
- Determinar si el regulador SsrB de SPI-2 actúa como des-represor de H-NS o como activador clásico de la transcripción de los genes *ssaG* y *pipB*.

V. MÉTODO EXPERIMENTAL

Cuadro 1. Antibióticos y dosis empleadas

Ampicilina	100 µg/ml
Estreptomicina	50 µg/ml
Kanamicina	30 µg/ml
Tetraciclina	12 µg/ml

Cuadro 2. Cepas bacterianas y plásmidos empleados

Cepas o plásmidos	Genotipo	Referencias
<i>E. coli</i>		
MC4100	Cepa silvestre de laboratorio; Str ^R	Casadaban, 1976
<i>E. coli</i> Δ <i>hns</i>	Derivada de MC4100; Δ <i>hns</i> ::km, Km ^R	Barba <i>et al</i> , 2005
<i>E. coli</i> Δ <i>stpA</i>	Derivada de MC4100; Δ <i>stpA</i> ::km, Str ^R Km ^R	Bustamante <i>et al</i> , no publicado
<i>E. coli</i> Δ <i>hha</i>	Derivada de MC4100; Δ <i>hha</i> ::km, Str ^R Km ^R	Bustamante <i>et al</i> , no publicado
<i>S. Typhimurium</i>		
<i>S. Tm</i> WT	Cepa silvestre SL 1344, Str ^R	Hoiseth <i>et al</i> , 1981
<i>S. Tm</i> Δ <i>sirA</i>	Derivada de SL 1344; Δ <i>sirA</i> ::km, Str ^R Km ^R	Bustamante <i>et al</i> , no publicado
<i>S. Tm</i> Δ <i>hilD</i>	Derivada de SL 1344; Δ <i>hilD</i> ::km, Str ^R Km ^R	Bustamante <i>et al</i> , sometido
<i>S. Tm</i> Δ <i>hilC</i>	Derivada de SL 1344; Δ <i>hilC</i> ::km, Str ^R Km ^R	Bustamante <i>et al</i> , sometido
<i>S. Tm</i> Δ <i>hilA</i>	Derivada de SL 1344; Δ <i>hilA</i> ::km, Str ^R Km ^R	Bustamante <i>et al</i> , sometido
<i>S. Tm</i> Δ <i>invF</i>	Derivada de SL 1344; Δ <i>invF</i> ::km, Str ^R Km ^R	Bustamante <i>et al</i> , sometido
<i>S. Tm</i> Δ <i>ssrB</i>	Derivada de SL 1344; Δ <i>ssrB</i> ::km, Str ^R Km ^R	Bustamante <i>et al</i> , sometido
Plásmidos		
pMPPM-T3	Vector de clonación de bajo número de copias; origen P15A; Tet ^R	Mayer, 1995
pT3-HilD1	Derivado de pMPPM-T3; contiene el gen estructural <i>hilD</i> y el sitio de unión a ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> .	Bustamante <i>et al</i> , sometido
pT3-HilA	Derivado de pMPPM-T3; contiene el gen estructural <i>hilA</i> y el sitio de unión a ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i>	Bustamante <i>et al</i> , no publicado

Cepas o plásmidos	Genotipo	Referencias
pT3-SsrB	Derivado de pMPM-T3; contiene el gen estructural <i>hila</i> y el sitio de unión a ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i>	Bustamante <i>et al</i> , sometido
pSirA-cat1	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>sirA-cat</i> , que lleva la región -563 a + 98, con respecto al sitio de inicio de la transcripción de <i>sirA</i>	Bustamante <i>et al</i> , sometido
pHilD-cat1	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilD-cat</i> , que lleva la región -364 a + 88, con respecto al sitio de inicio de la transcripción de <i>hilD</i>	Bustamante <i>et al</i> , sometido
pHilA-cat1	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilA-cat</i> , que lleva la región -410 a + 446, con respecto al sitio de inicio de la transcripción de <i>hila</i>	Bustamante <i>et al</i> , sometido
pInvF-cat1	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>invF-cat</i> , que lleva la región -306 a +213, con respecto al sitio de inicio de la transcripción de <i>invF</i>	Bustamante <i>et al</i> , no publicado
pSigD-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>sigD-cat</i> , que lleva la región -400 a +128, con respecto al sitio de inicio de la transcripción de <i>sigD</i>	Bustamante <i>et al</i> , sometido
pSsrAB-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssrAB-cat</i> , que lleva la región -303 a +3054, con respecto al sitio de inicio de la transcripción de <i>ssrAB</i>	Bustamante <i>et al</i> , sometido
pSsaG-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssaG-cat</i> , que lleva la región -232 a + 361, con respecto al sitio de inicio de la transcripción de <i>ssaG</i>	Bustamante <i>et al</i> , sometido
pPipB-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>pipB-cat</i> , que lleva la región -737 a +170, con respecto al sitio de inicio de la transcripción de <i>pipB</i>	Bustamante <i>et al</i> , sometido
pMPM-T6Ω	Vector de clonación que contiene un promotor inducido con arabinosa; Tc ^R	Mayer, 1995
pT6-HNSWT	Derivado de PMPM-T6Ω; contiene el gen estructural <i>hns</i>	Bustamante <i>et al</i> , sometido
pT6-HNSQ32AM	Derivado de PMPM-T6Ω; contiene el gen estructural <i>hns</i> con una mutación Q32AM	Bustamante <i>et al</i> , sometido

Condiciones de crecimiento

Las cepas fueron cultivadas en medio LB (Luria Bertani), a 37° C, en agitación. El medio de cultivo fue complementado con los diferentes antibióticos correspondientes. El medio LB contiene por litro: 10g de trisona, 5g de extracto de levadura y 10g de NaCl, a un pH de 7.5.

Electroporación

Los plásmidos se transformaron a las respectivas cepas de *S. Typhimurium* o *E. coli* mediante electroporación.

Para la preparación de células electrocompetentes se inocularon las cepas de interés en 5ml de medio LB, con los antibióticos correspondientes y se dejaron crecer a 37° C en agitación durante toda la noche.

Al día siguiente, se cultivó 500µl de cada inóculo en matraces con 100ml de LB, con los antibióticos correspondientes de cada cepa. Los matraces se incubaron a 37° C en agitación hasta una DO_{600nm} de 0.8.

Los cultivos se centrifugaron a 8.000rpm durante 8min a 4° C y, se desechó el sobrenadante. Se lavaron las pastillas con 30ml de agua tridestilada estéril y posteriormente con glicerol al 10%, centrifugando bajo las mismas condiciones en cada lavado. Las pastillas se resuspendieron en 250 µl y se almacenaron en tubos Eppendorf a -70° C.

La electroporación se llevó a cabo mezclando 40 µl de células electrocompetentes con 3 µl del plásmido correspondiente. La mezcla se vertió en

una celda para electroporación y se le dio un pulso eléctrico de 2.5 kV durante 5.5 ms en el electroporador “*E.coli pulser*” (BIORAD).

Las células se transfirieron a tubos de ensaye con 1ml de medio SOC (2g de bacto triptona, 0.5g de extracto de levadura, 200µl de kCl 1M, 1ml de MgSO₄ 1M y 0.36g de glucosa, aforado a 200ml con agua desionizada) y se incubaron en agitación y a 37° C por una hora.

Las células se sembraron en placas de LB con agarosa al 1.0% y con los antibióticos correspondientes para ser incubadas durante toda la noche a 37° C.

Determinación de la actividad específica de la enzima Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT)

Se inocularon las cepas que contienen los plásmidos con las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, en 5ml de medio LB, con los diferentes antibióticos correspondientes, durante toda la noche a 37° C en agitación.

Al día siguiente, los cultivos por duplicado se inocularon en matraces con 50ml de medio LB y con los antibióticos correspondientes a 37° C en agitación.

La expresión de los genes de los regulones SPI-1 y SPI-2 se analizó a las 4 y 9h de crecimiento, respectivamente.

Se tomaron muestras de 1.5 ml de cada cultivo, se transfirieron a tubos eppendorf y se centrifugaron 2 min a 12,000 rpm, desechando el sobrenadante. Cada pastilla se resuspendió en 800µl de buffer TDTT (Tris-HCl pH 7.8 50mM Dithiotreitol 30µM), se centrifugó bajo las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante.

Las pastillas se resuspendieron en 1ml de buffer TDTT, se sonicaron durante 10 min en el sonicador “Vibra Cell” (Sonios and Materials, Inc) y se centrifugaron a 12,000 rpm por 15min, recuperando el sobrenadante.

Para determinar la concentración de proteína total, cada pozo de la placa de cultivo celular de 96 pozos (Corning), se llenó con 10µl de cada extracto por duplicado y posteriormente con 200µl de la reacción del estuche BCA “Protein Assay Reagent” (Pierce), requerida para la cuantificación de proteínas.

La placa se incubó a 37°C durante 30min para posteriormente medir la absorbancia a 562nm en el lector automatizado de microplacas tipo CERES 900 C (Bio-Tek Instruments Inc) con el programa KC3. Los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en una curva estándar de diferentes concentraciones de la proteína BSA µg/µl, almacenada en el programa KC3.

Para determinar la actividad específica de CAT, se colocó por duplicado 5µl de cada extracto en los pozos de la placa de cultivo celular de 96 pozos (Corning) y se les agregó 200µl de la mezcla de la reacción Tris-HCl pH 7.8 0.1M, DTNB 1mM (5,5'-ditio-bis-2 ácido nitrobenzoico, Research Organics, Inc.), cloranfenicol 0.1mM (sigma) y Acetil CoA 0.1mM.

Se midió la absorbancia a 410nm en el mismo lector de microplacas a intervalos de 5seg durante 5min, posicionado en el modo de cinética. Las lecturas obtenidas se extrapolaron a una curva estándar de actividad CAT (0-2500 U/ml).

La actividad específica de CAT (µmol/mg/min) se determinó al dividir la lectura de actividad CAT entre la concentración de proteínas totales para cada extracto.

Análisis del patrón de proteínas secretadas

Se inocularon las cepas analizadas en 5ml de medio LB, durante toda la noche, a 37°C en agitación, con los diferentes antibióticos correspondientes.

Se transfirió, por duplicado, 50 µl de cada cultivo a 5ml de medio LB, con antibiótico. Las cepas se dejaron crecer a 37° C en agitación.

A las nueve horas de crecimiento, se tomaron muestras de 1.5ml de cada tubo por triplicado.

Estas muestras se centrifugaron 5min a 14,000 rpm. Se transfirió 1300 µl del sobrenadante a tubos nuevos.

Las proteínas en el sobrenadante se colectaron por precipitación. Para esto, a cada tubo se le agregó 200 µl de TCA al 100% y se dejaron precipitando durante toda la noche a 4° C.

Cada tubo se centrifugó 30min a 14,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se secaron las pastillas y se resuspendieron en 40 µl de sample buffer. Posteriormente se les agregó 1 µl de Tris-saturado. Se calentaron las muestras a 92° C y se concentró el triplicado de cada cepa en un mismo tubo.

Se cargó 40 µl de cada muestra en un gel de poliacrilamida al 12 %.

Experimento de dominancia negativa de H-NS

Para el experimento de dominancia negativa de H-NS se analizó el perfil de secreción de las cepas $\Delta hilD$, $\Delta hilA$ y $\Delta invF$, que contenían el plásmido pT6-HNSwt o pT6-HNSQ32am.

Las cepas mencionadas, se inocularon en 5ml de medio LB durante toda la noche a 37° C en agitación con los diferentes antibióticos correspondientes.

Se transfirió, por duplicado, 50 µl de cada cultivo a 5 ml de medio LB, con antibiótico. Las cepas se dejaron crecer a 37° C en agitación. A las dos horas de incubación, se agregó 0.1% de L-Arabinosa, solamente a uno de los dos cultivos de cada cepa, para inducir la expresión de las proteínas silvestre y mutante de H-NS.

A las siete horas de crecimiento, se tomaron muestras de cada cultivo por triplicado de 1.5ml y se analizó su perfil de proteínas secretadas.

VI. RESULTADOS

Análisis de la expresión de genes de *Salmonella* mediante fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*

Los genes reporteros codifican para proteínas que poseen una actividad enzimática única, por lo cual su expresión puede cuantificarse de manera sencilla, en presencia de su sustrato, mediante métodos colorimétricos.

Estos genes son utilizados para analizar la expresión y regulación de promotores funcionales. Para este análisis, se necesita ligar la región promotora del gen blanco (del cual nos interesa analizar su expresión), con la región codificante del gen reportero. Esta última región se inserta en una orientación específica, la cual le permite estar bajo el control del promotor del gen blanco. Así, los factores que controlan la expresión del gen blanco, regularán la expresión del gen reportero (Fig. 18).

La capacidad transcripcional del gen analizado, es estimada cuantitativamente por la actividad *in vitro* del producto del gen reportero.

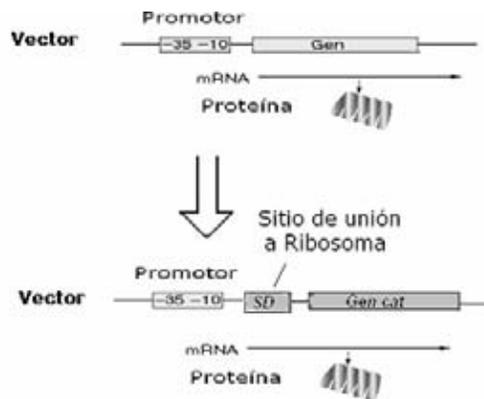


Figura 18. Modelo de una fusión transcripcional.

El gen reportero *cat* codifica para la enzima bacteriana cloranfenicol acetil transferasa (CAT). Esta enzima cataliza la transferencia del grupo acetilo del acetil CoA al cloranfenicol, por lo que se genera un grupo sulfidrilo CoA libre. Al reaccionar la molécula CoA con el reactivo 5,5'-ditio-bis-2 ácido nitrobenzoico (DTNB), se origina un producto de color amarillo. De esta forma, la producción e intensidad de este color es un indicador de la concentración de la proteína CAT.

La expresión de los genes de *Salmonella* *sirA*, *hilD*, *hilA*, *invF*, *sigD*, *ssrAB*, *ssaG* y *pipB* se analizó mediante las fusiones transcripcionales *sirA-cat*, *hilD-cat*, *hilA-cat*, *invF-cat*, *sigD-cat*, *ssrAB-cat*, *ssaG-cat* y *pipB-cat*, respectivamente. Para esto, los plásmidos que llevan estas fusiones se transformaron a la respectiva cepa de *Salmonella* o *E. coli*, que contenían o no otro plásmido que expresa alguno de los reguladores de SPI-1 o SPI-2.

El efecto del regulador H-NS sobre la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, lo analizamos principalmente en *E. coli*, pues mutaciones en *hns* tienen un efecto más severo en el crecimiento de *Salmonella*. Posiblemente, esto se deba a la expresión no controlada de los genes presentes en las islas de patogenicidad de *Salmonella* (Navarre, *et. al*, 2007).

Estudios previos realizados en este laboratorio han definido que la expresión máxima de los genes de SPI-1 se da al inicio de la fase estacionaria de crecimiento de *Salmonella* en el medio LB, lo cual es alrededor de la hora 4 de crecimiento en este medio. Mientras que la expresión máxima de los genes de SPI-2 se da en la fase estacionaria tardía, después de 9 horas de crecimiento en LB. Con base en estos antecedentes, en este estudio analizamos la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 a las horas 4 y 9 de crecimiento en LB, respectivamente.

Los experimentos se repitieron tres veces por duplicado, con el fin de determinar la reproducibilidad de los resultados. Los datos mostrados en cada gráfica, representan el promedio de tres experimentos diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar.

Efecto de H-NS sobre la expresión de los genes de SPI-1:

hilA-cat

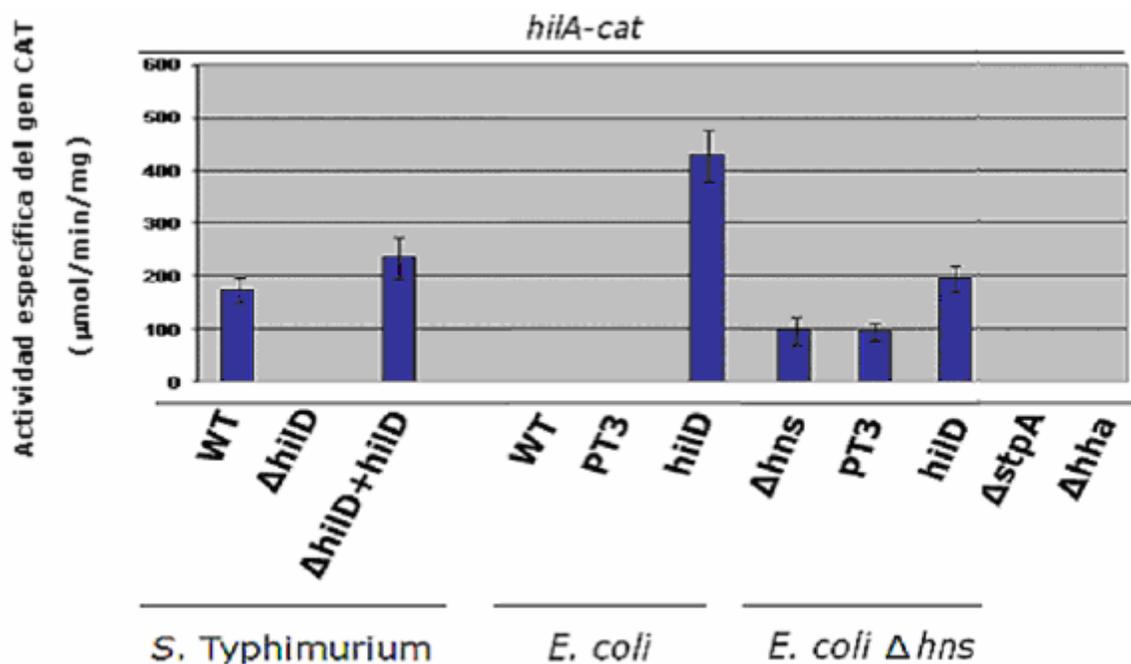


Figura 19. Efecto de H-NS sobre la expresión de *hilA*. La actividad específica de CAT expresada por el plásmido *philA-cat* se obtuvo en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en su derivada mutante $\Delta hilD$ conteniendo o no el plásmido *pT3-HilD*, que expresa *HilD*; así como en la cepa silvestre de *E. coli* y en sus derivadas mutantes Δhns , $\Delta stpA$ y Δhha conteniendo o no el plásmido *pT3-HilD*.

La fusión transcripcional *hilA-cat* se expresó en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* pero no en su derivada mutante $\Delta hilD$, o en la cepa silvestre de *E.*

coli. La presencia del plásmido pT3-HilD, que expresa a HilD, restauró la expresión de la fusión *hilA-cat* en la mutante $\Delta hilD$ e indujo la expresión de esta fusión en la cepa silvestre de *E. coli* (Fig. 19).

Estos resultados son consistentes con estudios que han mostrado que HilD regula positivamente la expresión de *hilA* (Ellermeier, *et. al*, 2005; Ellermeier y Slauch, 2008), aún en *E. coli*, lo cual sugiere que no se requiere de otro factor de *Salmonella*, además de HilD, para la expresión de *hilA*.

Para determinar el efecto de H-NS sobre la expresión de *hilA*, se analizó la expresión de la fusión *hilA-cat* en la mutante *E. coli* Δhns . Además, también se analizó la expresión de esta fusión en las mutantes *E. coli* $\Delta stpA$ y *E. coli* Δhha , que carecen de las proteínas semejantes a histonas StpA y Hha. Estas proteínas, al igual que H-NS, son consideradas reguladores globales que actúan principalmente como represores.

En contraste a lo observado en la cepa silvestre de *E. coli*, en la cepa mutante de *E. coli* Δhns , la fusión *hilA-cat* se expresó 100 veces más (Fig. 19), lo que indica que H-NS reprime la expresión de *hilA*. La presencia del plásmido que expresa HilD incrementó al doble la expresión de la fusión *hilA-cat* en la mutante *E. coli* Δhns , sugiriendo que HilD tiene un papel dual, como des-represor de H-NS y probablemente incrementando la eficiencia de la interacción de la RNA polimerasa al promotor de *hilA*, como se ha propuesto en estudios previos (Schechter y Lee, 2001; Boddicker, *et. al*, 2003; Olekhnovich y Kadner, 2006).

En contraste, en las mutantes *E. coli* Δ *stpA* y *E. coli* Δ *hha* no hubo expresión de la fusión *hila-cat*, sugiriendo que por si solas, las proteínas StpA y Hha no tienen un papel en la regulación de la expresión de *hila*.

Estos resultados además de confirmar los papeles de HilD y H-NS, como reguladores positivo y negativo de la expresión de *hila*, respectivamente, también indican que el efecto de H-NS sobre la expresión de genes de *Salmonella* puede analizarse de manera indirecta, en el fondo genético de *E. coli*.

sirA-cat

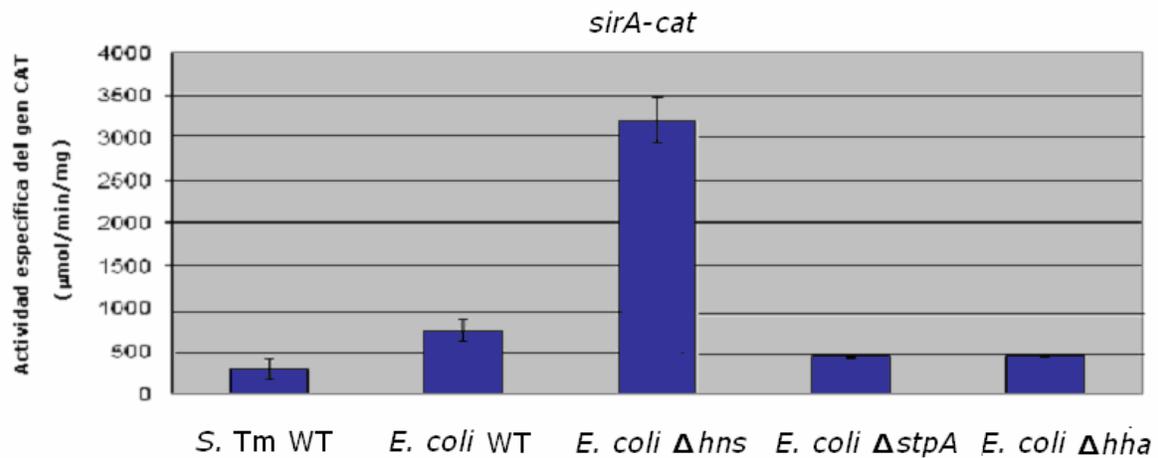


Figura 20. Efecto de H-NS sobre la expresión de *sirA*. La actividad específica de CAT expresada por el plásmido *psirA-cat* se obtuvo en las cepas silvestres de *S. Typhimurium* y *E. coli*; así como en las derivadas mutantes de *E. coli* Δ *hns*, Δ *stpA* y Δ *hha*.

La fusión transcripcional *sirA-cat* se expresó en las cepas silvestre de *S. Typhimurium* y *E. coli*, lo cual es consistente con que SirA es ortólogo de UvrY de *E. coli*, y por lo tanto, los mismos factores ambientales que inducen la expresión de *uvrY*, podrían inducir la expresión de *sirA* en *E. coli*.

Para determinar el efecto de H-NS sobre la expresión de *sirA*, se analizó la expresión de la fusión *sirA-cat* en la mutante *E. coli* Δhns . En ausencia de HNS, la expresión transcripcional de la fusión *sirA-cat* se incrementó 2.5 veces del nivel que se expresa esta fusión en la cepa silvestre de *E. coli* (Fig. 20), por lo que se puede afirmar que H-NS reprime la expresión de *sirA*, sin embargo, dicha represión es parcial ya que SirA se expresa en presencia de H-NS. De esta manera, H-NS mantiene un nivel de expresión de SirA suficiente para inducir la expresión de *hilD*.

Además, se analizó la expresión de esta fusión en las mutantes *E. coli* $\Delta stpA$ y *E. coli* Δhha . En contraste con lo que se observa en la mutante *E. coli* Δhns , en las mutantes *E. coli* $\Delta stpA$ y *E. coli* Δhha el nivel de expresión de la fusión *hila-cat* fue aproximadamente el mismo del nivel que se expresa esta fusión en la cepa silvestre de *E. coli*, lo que sugiere que por si solas, las proteínas StpA y Hha no tienen un papel en la regulación de la expresión de *sirA*.

hilD-cat

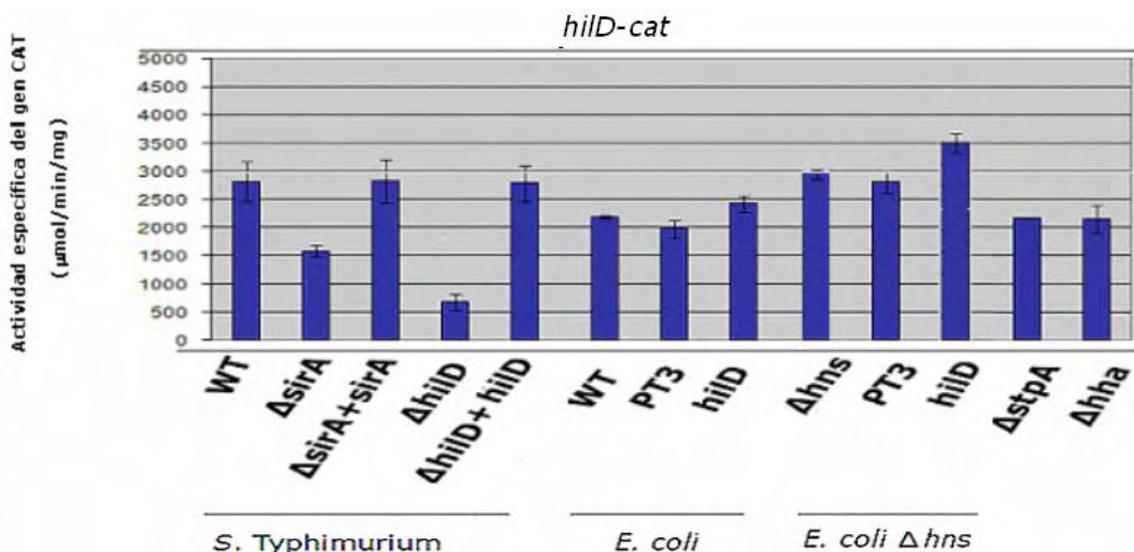


Figura 21. Efecto de H-NS sobre la expresión de *hilD*. La actividad específica de CAT expresada por el plásmido *philD-cat* se obtuvo en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en sus derivadas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta hilD$ conteniendo o no el plásmido *pT3-SirA* o *pT3-HilD* que expresan *SirA* y *HilD*, respectivamente; así como en la cepa silvestre de *E. coli* y en sus derivadas mutantes Δhns , $\Delta stpA$ y Δhha conteniendo o no el plásmido *pT3-HilD*.

La expresión de la fusión transcripcional *hilD-cat* disminuyó en las mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta hilD$, con respecto a su expresión en la cepa silvestre de *S. Typhimurium*.

En la mutante $\Delta sirA$ la expresión de la fusión *hilD-cat* se redujo al 55% del nivel que se expresa esta fusión en la cepa silvestre de *S. Typhimurium*, lo cual es

consistente con estudios previos que indican que SirA se requiere sólo para la expresión máxima de *hilD* (Ellermeier, *et. al*, 2005). La presencia del plásmido pT3-SirA, que expresa a SirA, restauró la expresión de la fusión *hilD-cat* en la mutante $\Delta sirA$ (Fig. 21).

En la mutante $\Delta hilD$ la expresión de la fusión *hilD-cat* se redujo al 25% del nivel que se expresa en la cepa silvestre de *S. Typhimurium*. La presencia del plásmido pT3-HilD, que expresa a HilD, restauró la expresión de la fusión *hilD-cat* en la mutante $\Delta hilD$ (Fig. 21). Estos resultados indican que *hilD* se auto-regula positivamente, como ha sido reportado previamente (Ellermeier, *et. al*, 2005; Olekhnovich y Kadner, 2007; Ellermeier y Slauch, 2008).

De esta manera, la expresión transcripcional de *hilD* en *S. Typhimurium*, está controlada por los reguladores HilD y SirA, siendo este último necesario para la expresión óptima de *hilD*.

La fusión *hilD-cat* se expresó en la cepa silvestre de *E. coli* (Fig. 21). La presencia del plásmido pT3-HilD, que expresa a HilD, no incrementó la expresión de la fusión *hilD-cat* en esta cepa (Fig. 21), lo que indica que en *E. coli* se reduce la necesidad de HilD para la expresión transcripcional de *hilD*. Aún cuando *E. coli* expresa UvrY, el homólogo de SirA, nuestros resultados indican que HilD es esencial para la expresión de su gen (Fig. 21).

Así, nosotros proponemos la existencia de un represor de *hilD* en *S. Typhimurium*, el cual mantiene reprimida la expresión de *hilD* en la mutante de *S. Typhimurium* $\Delta hilD$. Es probable que la función de HilD y SirA sea la de contrarrestar la represión mediada por este regulador negativo. Dicho represor

podría estar ausente en *E. coli* y de esta manera ya no se requiere de HilD para que se exprese el gen *hilD*.

Para determinar el efecto de H-NS sobre la expresión de *hilD*, se analizó la expresión de la fusión *hilD-cat* en la mutante *E. coli* Δhns . Además, también se analizó la expresión de esta fusión en las mutantes *E. coli* $\Delta stpA$ y *E. coli* Δhha .

En la cepa mutante de *E. coli* Δhns , el nivel de expresión de la fusión *hilD-cat* fue el mismo que en la cepa silvestre de *E. coli*, en presencia o ausencia del plásmido pT3-HilD que expresa a HilD (Fig. 21), indicando que H-NS no reprime a *hilD*.

En las mutantes *E. coli* $\Delta stpA$ y *E. coli* Δhha el nivel de expresión de la fusión *hilD-cat* fue el mismo del nivel que se expresa esta fusión en la cepa silvestre de *E. coli*, sugiriendo que StpA y Hha no tienen un papel en la regulación de la expresión de *hilD*.

invF-cat

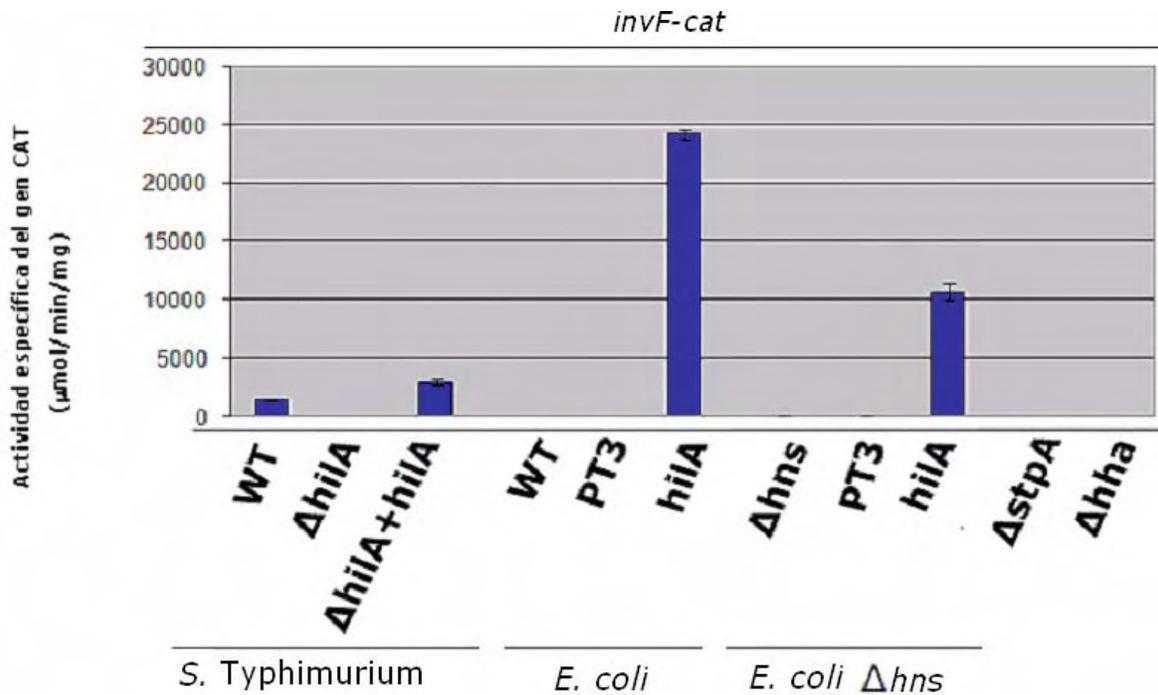


Figura 22. Efecto de H-NS sobre la expresión de *invF*. La actividad específica de CAT expresada por el plásmido *pinvF-cat* se obtuvo en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en su derivada mutante ΔhilA conteniendo o no el plásmido *pT3-HilA*, que expresa *HilA*; así como en la cepa silvestre de *E. coli* y en sus derivadas mutantes Δhns , ΔstpA y Δhha conteniendo o no el plásmido *pT3-HilA*.

La fusión transcripcional *invF-cat* se expresó en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* pero no en su derivada mutante ΔhilA , o en la cepa silvestre de *E. coli*. La presencia del plásmido *pT3-HilA*, que expresa a *HilA*, restauró la expresión de la fusión *invF-cat* en la mutante ΔhilA e indujo la expresión de esta

fusión en la cepa silvestre de *E. coli*, a un nivel 20 veces mayor que la expresión de esta fusión en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* (Fig. 22).

Estos resultados demuestran que HilA regula positivamente la expresión de *invF* (Boddicker, *et. al*, 2003), aún en *E. coli*, lo cual sugiere que no se requiere de otro factor de *Salmonella*, además de HilA, para la expresión de *invF*.

El incremento en la expresión de la fusión *invF-cat* inducido por HilA en *E. coli*, podría sugerir que en *S. Typhimurium* hay reguladores negativos, además de HilA, que se encargan de mantener un nivel de expresión determinado de *invF*.

Para determinar el efecto de H-NS sobre la expresión de *invF*, se analizó la expresión de la fusión *invF-cat* en la mutante *E. coli* Δhns . Además, se analizó la expresión de esta fusión en las mutantes *E. coli* $\Delta stpA$ y *E. coli* Δhha .

En las mutantes *E. coli* Δhns , *E. coli* $\Delta stpA$ y *E. coli* Δhha no hubo expresión de la fusión *invF-cat*, sugiriendo que las proteínas H-NS, StpA y Hha no tienen un papel en la regulación de la expresión de *invF*. La presencia del plásmido pT3-HilA indujo la expresión de la fusión *invF-cat* en la mutante *E. coli* Δhns (Fig. 22).

sigD-cat

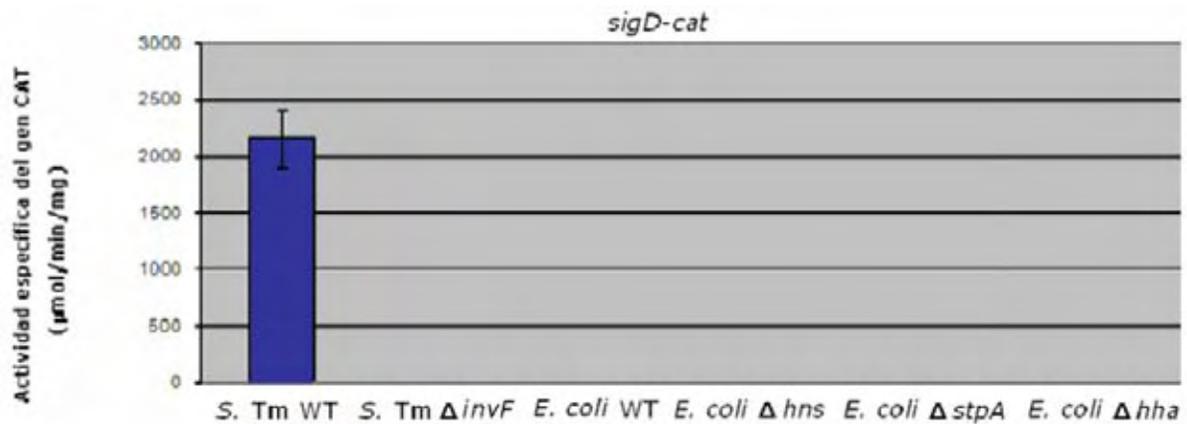


Figura 23. Efecto de H-NS sobre la expresión de *sigD*. La actividad específica de CAT expresada por el plásmido *psigD-cat* se obtuvo en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en su derivada mutante $\Delta invF$; así como en la cepa silvestre de *E. coli* y en sus derivadas mutantes Δhns , $\Delta stpA$ y Δhha .

La fusión transcripcional *sigD-cat* se expresó en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* pero no en su derivada mutante $\Delta invF$ o en la cepa silvestre de *E. coli* (Fig. 23), lo cual es consistente con que *E. coli* no tiene el gen *invF*.

Para determinar el efecto de H-NS sobre la expresión de *invF*, se analizó la expresión de la fusión *sigD-cat* en la mutante *E. coli* Δhns . Además, también se analizó la expresión de esta fusión en las mutantes *E. coli* $\Delta stpA$ y *E. coli* Δhha .

En estas mutantes no hubo expresión de la fusión *sigD-cat*, lo que sugiere que las proteínas H-NS, StpA y Hha no tienen un papel en la regulación de la expresión de *sigD*.

Análisis del efecto de H-NS sobre el patrón de proteínas secretadas por SPI-1

En cultivos de *Salmonella* crecidos en LB, se puede detectar la presencia en el medio de cultivo de las proteínas SipA, SipB y SipC, codificadas en SPI-1, que son secretadas a través del SST3, también codificado en SPI-1. Además, en estas condiciones de crecimiento también se detecta la presencia de la subunidad del flagelo FliC, la cual se secreta por el SST3 flagelar (Komoriya, *et. al*, 1999).

Como otra manera de confirmar el papel que tienen los reguladores transcripcionales SirA, HilC, HilD, HilA e InvF sobre la expresión de los genes de SPI-1, se analizó el perfil de secreción de proteínas a partir de extractos de proteínas secretadas en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en sus derivadas mutantes $\Delta sirA$, $\Delta hilD$, $\Delta hilC$, $\Delta hilA$ e $\Delta invF$. Las muestras se analizaron de cultivos crecidos en medio LB en agitación durante 7 horas a 37° C. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

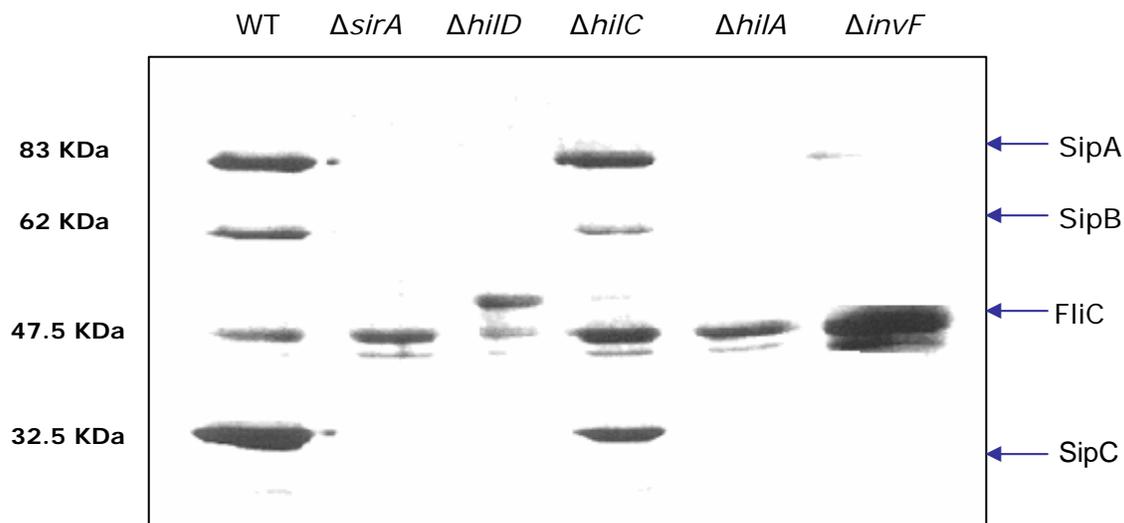


Figura 24. Patrón de proteínas secretadas por SPI-1. El perfil de secreción de proteínas se obtuvo a partir de proteínas secretadas por la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y por sus derivadas mutantes $\Delta sirA$, $\Delta hilD$, $\Delta hilC$, $\Delta hilA$ y $\Delta invF$.

En las cepas mutantes $\Delta sirA$, $\Delta hilD$, $\Delta hilC$, $\Delta hilA$ y $\Delta invF$ no se detectaron las proteínas de invasión SipA, SipB y SipC de *S. Typhimurium*. Estos resultados son consistentes con los resultados de nuestro análisis de las fusiones transcripcionales de genes de SPI-1 y con estudios previos que han mostrado que SirA, HilD, HilA e InvF generan una compleja cascada de regulación que controla la expresión de los genes de invasión de SPI-1 (Ellermeier, *et. al*, 2005).

No obstante, en la mutante *hilC*, la secreción de proteínas fue igual que en la cepa silvestre, pues se sabe que en ausencia de HilC, el fenotipo de invasión a células epiteliales no se ve afectado.

Nuestros experimentos de las figuras 19, 22 y 23 indican que HilD induce la expresión de *hila*, principalmente al contrarrestar la represión que ejerce H-NS. En contraste, HilA e InvF se requieren para la expresión de sus genes blanco, aún en ausencia de H-NS, lo que indica que HilA e InvF no actúan como des-represores de H-NS sino probablemente como activadores clásicos que median la interacción de la RNA polimerasa sobre los promotores. Para confirmar estos resultados se analizó el patrón de proteínas secretadas con dominancia negativa de H-NS en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en sus derivadas mutantes $\Delta sirA$, $\Delta hilD$, $\Delta hilC$, $\Delta hila$ e $\Delta invF$.

La dominancia negativa suele asociarse con proteínas que actúan como dímeros o con componentes de complejos multiméricos. Las proteínas de unión a ADN que actúan como dímeros, conservan un dominio N-terminal, responsable de la capacidad de oligomerización de la proteína y un dominio C-terminal, responsable de la capacidad de dicha proteína para unirse al ADN.

La dominancia negativa de H-NS se lleva a cabo de la siguiente manera: se hace una mutación de paro en el dominio C-terminal. Esta mutación transforma un codón codificante para un aminoácido, en un codón de paro (*stop*). De esta forma, el gen *hns* con esta mutación expresa solo la región N-terminal de H-NS, la cual conserva su capacidad de oligomerización, pero no de unirse al ADN y reprimir la expresión de sus genes blanco. Al sobre-expresarse esta proteína H-NS troncada en la cepa silvestre de *S. Typhimurium*, ésta secuestra a las proteínas H-NS silvestres, formando dímeros inactivos.

El perfil de secreción de proteínas con dominancia negativa fue analizado a partir de extractos de proteínas secretadas en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en sus derivadas mutantes $\Delta hilD$, $\Delta hilD$ + H-NS silvestre, $\Delta hilD$ + H-NS Q32am, $\Delta hilA$, $\Delta hilA$ + HNS silvestre, $\Delta hilA$ + H-NS Q32am, $\Delta invF$, $\Delta invF$ + HNS silvestre y $\Delta invF$ + H-NS Q92am. Para esto, los plásmidos pT6-HNS-WT y pT6-HNS- Q32am se transformaron a la respectiva cepa de *Salmonella*. Las cepas se crecieron en medio LB en agitación durante 9 horas a 37° C, sin arabinosa o con ella al 0.1%, para inducir la expresión de la dominante negativa *hns*. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

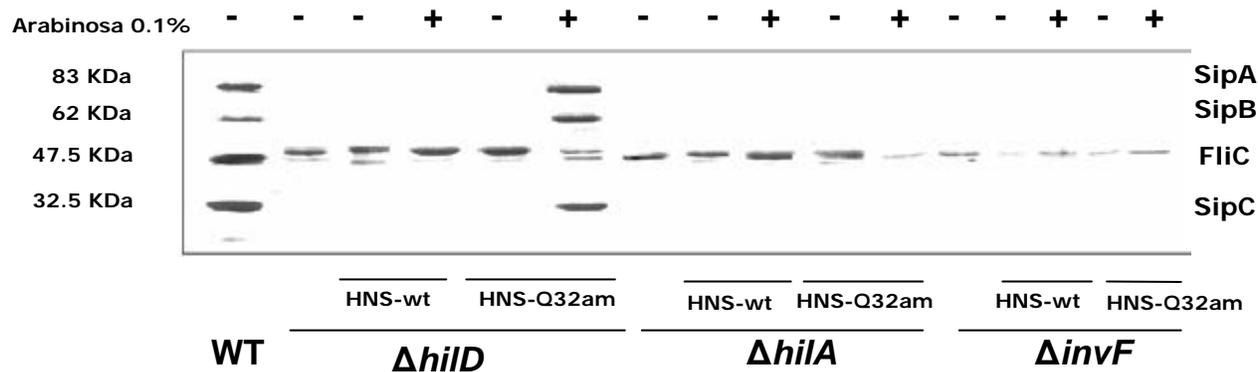


Figura 25. Efecto de H-NS sobre el patrón de proteínas secretadas por SPI-1.

El perfil de secreción de proteínas con dominancia negativa se obtuvo a partir de extractos de proteínas secretadas en la cepa silvestre de S. Typhimurium y en sus derivadas mutantes $\Delta hilD$, $\Delta hilA$ y $\Delta invF$, en presencia o no de las proteínas HNS silvestre o HNS-Q32am, las cuales se expresan a partir del promotor inducible con

arabinosa. Como control, el experimento también se realizó en ausencia de inducción con arabinosa (signo de menos).

Las proteínas SipA, SipB y SipC se secretaron en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* pero no en las mutantes $\Delta hilD$, $\Delta hilA$ o $\Delta invF$ (Fig. 25). La secreción de estas proteínas se restauró en la mutante $\Delta hilD$ al expresarse la región N-terminal de H-NS que actúa como dominante negativo, pero no se restauró cuando se expresó H-NS silvestre (Fig.25). Este resultado es consistente con que HilD induce la expresión de *hilA*, y como consecuencia de los genes de SPI-1, principalmente al contrarrestar la represión que ejerce H-NS sobre *hilA*. Por esta razón, cuando se inactiva H-NS por dominancia negativa ya no se requiere a HilD para que para la RNA polimerasa pueda iniciar la transcripción del promotor de *hilA*, y la subsiguiente transcripción de los genes de SPI-1. Esto confirma que HilD actúa principalmente como un des-represor de H-NS.

En las mutantes $\Delta hilA$ e $\Delta invF$ no se restauró la secreción de las proteínas SipA, SipB y SipC cuando se inactivó H-NS por dominancia negativa (Fig. 25). Estos resultados indican que HilA e InvF, no actúan como des-represores de H-NS, sino probablemente como activadores clásicos de la transcripción que permiten el posicionamiento de la RNA polimerasa sobre sus genes blanco.

Efecto de H-NS sobre la expresión de los genes de SPI-2:

ssrAB-cat

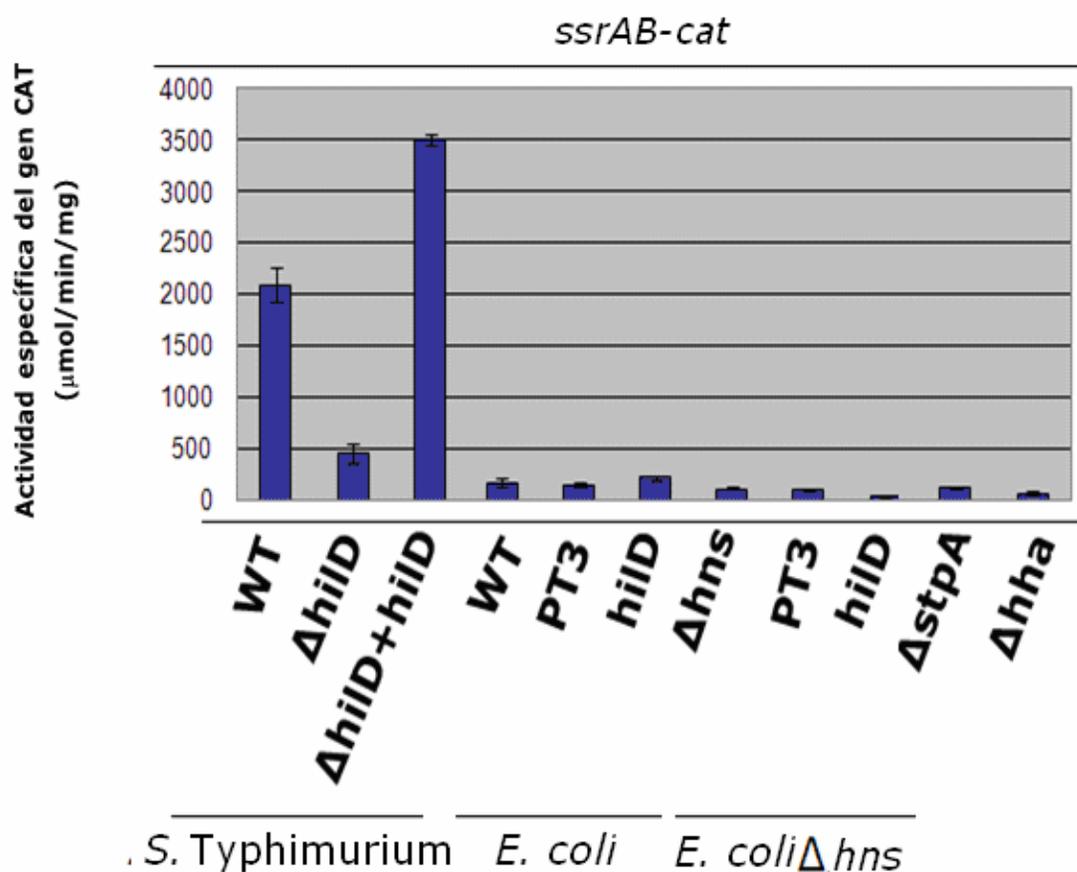


Figura 26. Efecto de H-NS sobre la expresión de *ssrAB*. La actividad específica de CAT expresada por el plásmido *pssrAB-cat* se obtuvo en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en su derivada mutante ΔhilD conteniendo o no el plásmido pT3-HilD, que expresa HilD; así como en la cepa silvestre de *E. coli* y en sus derivadas mutantes Δhns, ΔstpA y Δhha conteniendo o no el plásmido pT3-HilD.

La fusión transcripcional *ssrAB-cat* se expresó en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y su expresión se redujo al 20% en la mutante $\Delta hild$ (Fig. 26). La presencia del plásmido pT3-HilD, que expresa a HilD, restauró la expresión de la fusión *ssrAB-cat* en la mutante $\Delta hild$ (Fig. 26). Estos resultados son consistentes con estudios previos realizados en el laboratorio del Dr. José Luis Puente, que han mostrado que HilD regula positivamente la expresión de *ssrAB* cuando se crece a *Salmonella* en el medio de cultivo LB.

La expresión de la fusión *ssrAB-cat* en la cepa silvestre de *E. coli* se redujo al 10% del nivel que se expresa esta fusión en la cepa silvestre de *S. Typhimurium*. La presencia del plásmido pT3-HilD1, que expresa a HilD, no indujo la expresión de esta fusión, en contraste a lo que observamos para *hila*, que HilD puede inducir su expresión en *E. coli* (Fig.1). Esto podría sugerir que HilD induce la expresión de *ssrAB* a través de otro regulador de *S. Typhimurium* o junto con este otro regulador.

Para determinar el efecto de H-NS sobre la expresión de *ssrAB*, se analizó la expresión de la fusión *ssrAB-cat* en la mutante *E. coli* Δhns . En esta mutante, no se incrementa la expresión de esta fusión, ni aún en la presencia del plásmido pT3-HilD1, que expresa HilD.

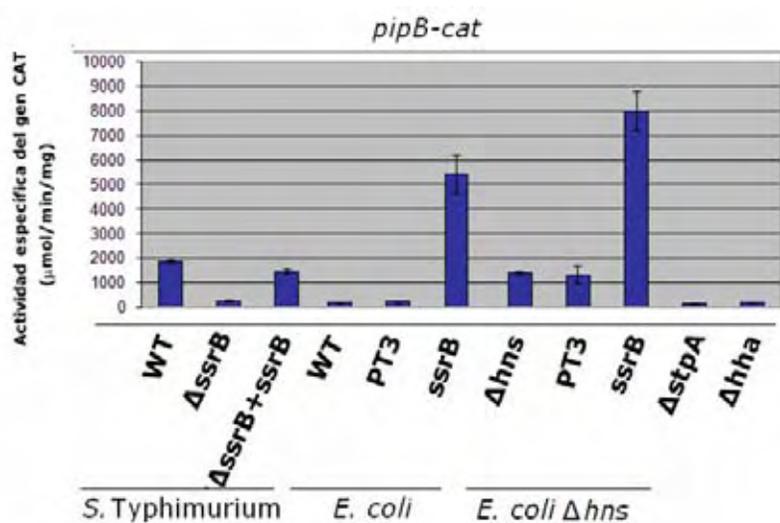
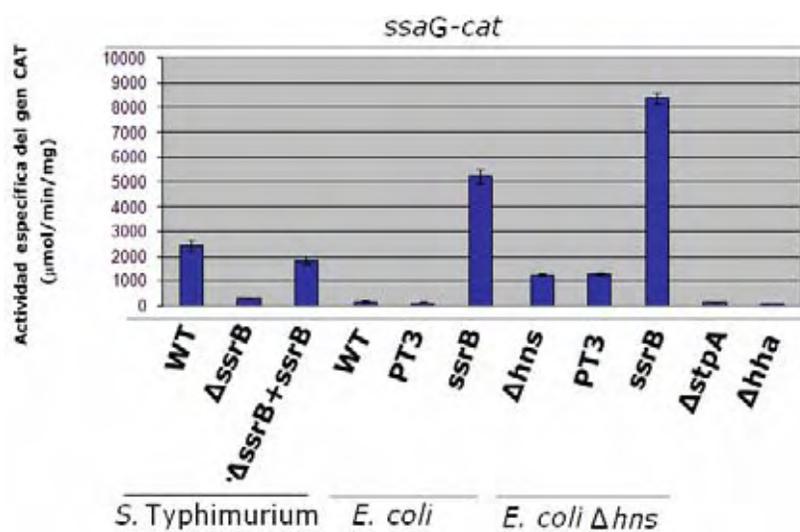
En estudios previos se determinó que en *S. Typhimurium* HilD deja de requerirse para la expresión de *ssrAB* cuando se inactiva a H-NS, sugiriendo que HilD induce la expresión de *ssrAB* actuando como des-represor de H-NS (Bustamante, *et. al*, no publicado), al igual como lo hace para inducir la expresión

de *hilA* (Schechter y Lee, 2001; Boddicker, *et. al*, 2003; Ellermeier, *et. al*, 2005; Ellermeier y Slauch, 2008).

La aparente contradicción entre los resultados obtenidos en este estudio y los estudios previos, podría ser debido a que la expresión de *ssrAB* en *S. Typhimurium* requiere la acción de HILD, que contrarresta la represión de H-NS, pero también requiere de otro regulador de *Salmonella* que actuaría como activador clásico de *ssrAB*.

Por otro lado, también se analizó la expresión de la fusión *ssrAB-cat* en las mutantes *E. coli* Δ *stpA* y *E. coli* Δ *hha*. En estas mutantes, no hubo expresión de la fusión *ssrAB-cat*, lo que sugiere que por si solas, las proteínas StpA y Hha no mantienen reprimida la expresión de *ssrAB* en *E. coli*.

ssaG-cat y *pipB-cat*



Figuras 27 y 28. Efecto de H-NS sobre la expresión de *ssaG* y *pipB*. La actividad específica de CAT expresada por los plásmidos *pssaG-cat* y *pipB-cat* se obtuvo en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en su derivada mutante Δ ssrAB conteniendo

o no el plásmido *pT3-SsrB*, que expresa *SsrB*; así como en la cepa silvestre de *E. coli* y en sus derivadas mutantes Δhns , $\Delta stpA$ y Δhha conteniendo o no el plásmido *pT3-SsrB*.

La fusiones transcripcionales *ssaG-cat* y *pipB-cat* se expresaron en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* pero no en su derivada mutante $\Delta ssrB$, o en la cepa silvestre de *E. coli*. La presencia del plásmido *pT3-SsrB*, que expresa a *SsrB*, restauró la expresión de la fusiones *ssaG-cat* y *pipB-cat* en la mutante $\Delta ssrB$ e indujo la expresión de esta fusión en la cepa silvestre de *E. coli* (Fig. 27 y 28). Estos resultados demuestran que *SsrB* regula positivamente la transcripción de *ssaG* y *pipB* (Walthers, *et. al*, 2007), aún en *E. coli*, lo cual sugiere que no se requiere de otro factor de *Salmonella*, además de *SsrB*, para la expresión de *ssaG* y *pipB*.

La diferencia en el nivel de expresión transcripcional que se observa en las cepas silvestres *E. coli* y *S. Typhimurium*, en presencia de *SsrB*, podría sugerir que en *S. Typhimurium* hay reguladores negativos que no permiten que la expresión de *ssaG* y *pipB* pase de un cierto nivel que podría ser el adecuado para su función.

Para determinar el efecto de H-NS sobre la expresión de *ssaG* y *pipB*, se analizó la expresión de las fusiones *ssaG-cat* y *pipB-cat* en la mutante *E. coli* Δhns . Además, se analizó la expresión de esta fusión en las mutantes *E. coli* $\Delta stpA$ y *E. coli* Δhha .

En contraste a lo observado en la cepa silvestre de *E. coli*, en la cepa mutante de *E. coli* Δhns , las fusiones *ssaG-cat* y *pipB-cat* se expresaron 10 veces más (Fig. 27 y 28), indicando que H-NS reprime la expresión de *ssaG* y *pipB*.

La presencia del plásmido pT3-SsrB incrementó aún mas la expresión de las fusiones *ssaG-cat* y *pipB-cat* en la mutante *E. coli* Δhns , lo cual sugiere SsrB tiene un doble papel en la expresión de los genes *ssaG* y *pipB*. Por un lado, actúa como des-represor de H-NS y por otro podría actuar como un activador clásico.

En contraste, en las mutantes *E. coli* $\Delta stpA$ y *E. coli* Δhha no hubo expresión de las fusiones *ssaG-cat* y *pipB-cat*, sugiriendo que por si solas, las proteínas StpA y Hha no tienen un papel en la regulación de la expresión de *ssaG*-y *pipB*.

VII. DISCUSIÓN

El proceso que lleva a la integración de islas de patogenicidad en los genomas bacterianos, involucra una serie de eventos que determinan la evolución de una bacteria patógena.

La expresión inapropiada de los genes adquiridos a través de eventos de transferencia horizontal, puede derivar tanto en la pérdida del hospedero como en la del material genético adquirido. Este fenómeno se produce debido a que la expresión inadecuada de estos genes puede interferir con la función celular, siendo perjudicial para la bacteria. Para evitar esto, las bacterias integran la expresión de los genes adquiridos a los mecanismos de regulación preexistentes, lo cual permite que estos genes sean expresados en el nicho adecuado, donde sea ventajoso para las bacterias. De esta manera, los genomas de las bacterias pueden expandir su repertorio genético funcional.

H-NS es una proteína que interacciona con las secuencias de ADN con un contenido alto de A+T, como las que comúnmente se localizan en los promotores de los genes de *Salmonella* y otras bacterias entéricas. Su capacidad de interaccionar entre sí permite la formación de complejos de H-NS/ADN, los cuales atrapan a la RNA polimerasa sobre los promotores o impiden su acceso a éstos. Por esta razón, actúa como regulador global reprimiendo la expresión de un gran número de genes (Dorman, 2006 y Bouffartigues, *et. al*, 2007).

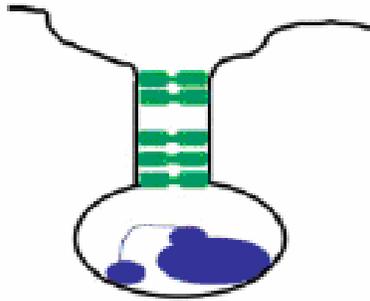


Figura 29. Cuando H-NS forma puentes entre regiones del ADN cercanos a los promotores se genera una estructura en forma de collar que atrapa a la RNA polimerasa en el promotor, inhibiendo la transcripción (Dorman, 2007).

Durante la evolución de bacterias patógenas, H-NS ha actuado como un centinela que protege a las células de los efectos negativos de los genes adquiridos por transferencia horizontal, como los localizados en las SPI's (Navarre, *et. al.*, 2006; Lucchini, *et. al.*, 2006).

Los mecanismos que controlan la expresión de los genes adquiridos involucran a reguladores transcripcionales cuya función es contrarrestar la represión que ejerce H-NS sobre los promotores de dichos genes (Navarre, *et. al.*, 2007).

Reguladores que pertenecen a diferentes familias de reguladores transcripcionales tienen la capacidad de contrarrestar específicamente la represión que ejerce H-NS sobre algunos genes. Ler, que pertenece a la familia de H-NS, contrarresta la represión mediada por H-NS sobre los genes LEE de los patógenos

A/E (Bustamante, *et. al*, 2001; Haack, *et. al.*, 2003; Barba, *et. al*, 2005; Gauthier, *et. al*, 2005). RovA, de la familia de SlyA, contrarresta la represión de H-NS sobre los genes *inv* y *rovA* en *Yersinia* (Heroven, *et. al*, 2004). En *Salmonella*, HilD de la familia de AraC, el sistema de dos componentes, SsrA/B de la familia de OmpR/EnvZ, así como LeuO de la familia de LysR, eliminan la represión que ejerce H-NS sobre los genes *hila*, SPI-2 y *ompS1*, respectivamente (Schechter y Lee, 2001; De la Cruz, *et. al*, 2007; Walthers, *et. al*, 2007).

Para eliminar la represión de H-NS, esta clase de reguladores se unen a sitios cercanos o sobrelapados a los sitios primarios de unión de H-NS. La unión de estos reguladores desplaza al complejo represor formado por H-NS sobre los promotores y, de esta manera se libera la expresión de sus genes blanco.

H-NS tiene un papel de regulación sobre la expresión de los genes de virulencia de *S. Typhimurum*. Varios estudios han reportado que H-NS reprime la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 (Duong, *et. al*, 2007; Olekhovich y Kadner, 2007; Walthers, *et. al*, 2007). Sin embargo, antes de este trabajo no se sabía si H-NS reprime directamente cada uno de los genes de estas islas, o reprime únicamente alguno de los genes que codifican para los reguladores necesarios para la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2. Aunado a esto, no se sabía con claridad si todos los reguladores codificados en SPI-1 y SPI-2 actúan como des-represores de H-NS.

En este estudio demostramos que H-NS controla negativamente la expresión de los genes de SPI-1, al reprimir directamente la expresión de *hila*. Como consecuencia de esto, se reprime la expresión de los genes regulados directamente

por HilA, como *invF* y los genes regulados por InvF, como *sigD*. Nuestros resultados indican que HilD induce la expresión de *hila* al eliminar la represión de H-NS sobre el promotor de *hila*, como ha sido reportado en otros estudios (Olekhnovich y Kadner, 2007; Boddicker, *et. al*, 2003).

En contraste, los reguladores HilA e InvF se requieren para la expresión de sus genes blanco aún en ausencia de H-NS, sugiriendo con esto que ellos actúan como activadores clásicos que median la interacción de la RNA polimerasa con los promotores.

Nuestros experimentos también revelaron que H-NS reprime la expresión de SirA; sin embargo, dicha represión es parcial ya que SirA se expresa en presencia de H-NS a una concentración que es suficiente para inducir la expresión de *hilD*. En la figura 30 se muestra un modelo que resume nuestros resultados de la regulación de H-NS sobre los genes de SPI-1.

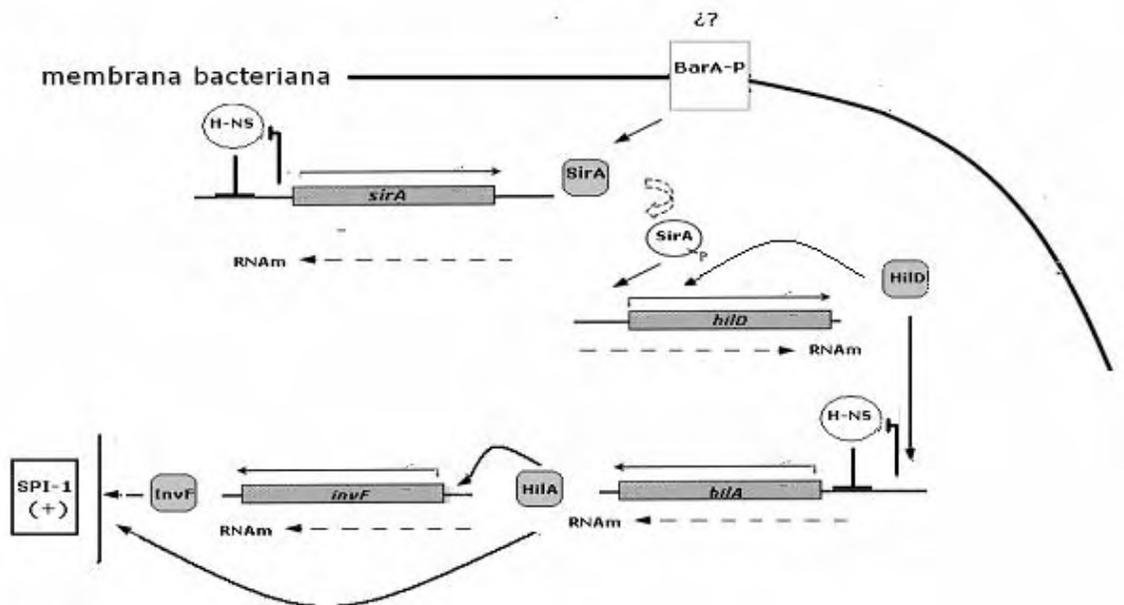


Figura 30: Modelo de la regulación transcripcional de los genes de SPI-1. H-NS controla negativamente la expresión de los genes de SPI-1 al reprimir directamente la expresión de *sirA* y *hila*. La expresión transcripcional de *hilD*, está controlada por los reguladores Hild y SirA, siendo este último necesario para la expresión óptima de *hilD*. Además, Hild induce la expresión de *hila* al eliminar la represión de H-NS sobre el promotor de *hila*. Los reguladores Hila e InvF actúan como activadores clásicos.

Así mismo, se demostró que H-NS controla negativamente la expresión de los genes del regulón SPI-2, al reprimir directamente la expresión de *ssaG* y *pipB*. Nuestros resultados sugieren que el regulador SsrB tiene un doble papel en la expresión de los genes del regulón SPI-2. Por un lado, actúa como des-represor de H-NS, pero es capaz de incrementar la expresión de sus genes blanco aún en ausencia de H-NS (Fig. 27 y 28). Esto podría deberse a que además de ser un des-

repressor de H-NS, SsrB pudiera actuar como un activador clásico, ayudando a la interacción de la RNA polimerasa sobre los promotores de SPI-2 (Fig. 31).

Sin embargo, también podría ser que en ausencia de H-NS, otra proteína semejante a histona, como StpA o Hha, mantenga una represión parcial de los genes de SPI-2, la cual sea contrarrestada por SsrB.

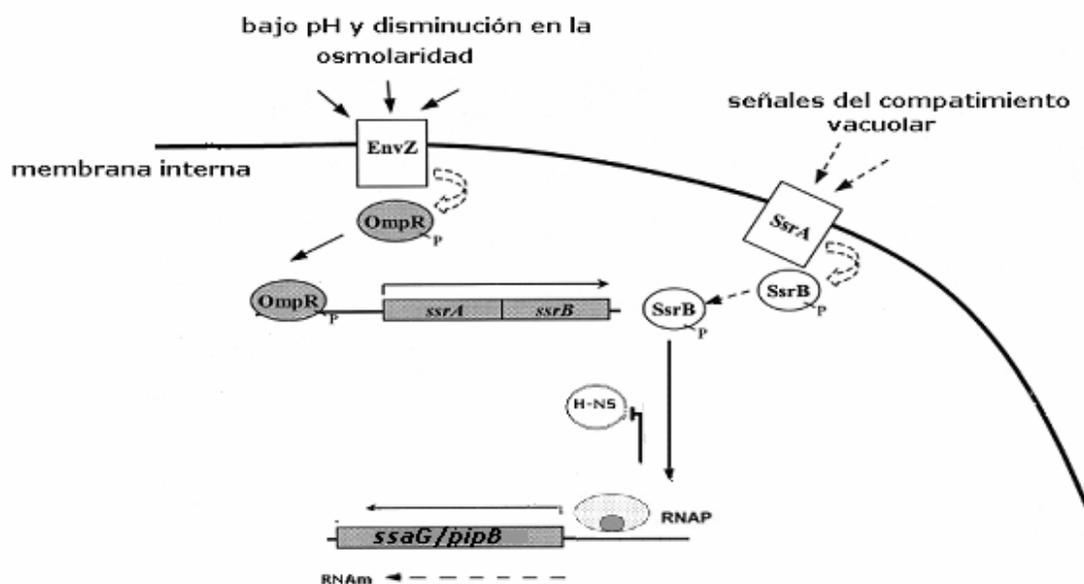


Figura 31. Modelo de la regulación transcripcional de los genes de SPI-2. H-NS controla negativamente la expresión de los genes de SPI-2 al reprimir directamente la expresión de *ssaG* y *pipB*. El regulador de respuesta SsrB actúa como des-represor de H-NS y probablemente como un activador clásico.

StpA se encuentra de forma predominante formando heterodímeros con H-NS, siendo capaz de complementar algunos fenotipos de una mutante Δhns (Navarre, *et. al.*, 2007). Sin embargo, en este estudio no se observó un papel

definido de StpA en la represión de los genes de los regulones de SPI-1 y SPI-2, por lo que el efecto de StpA como regulador de la expresión génica debe ser caracterizado en cepas mutantes Δhns , en las que los niveles de la proteína StpA se incrementan.

Por otra parte, se sabe que Hha interactúa con H-NS para modular la expresión de los genes de virulencia en bacterias Gram-negativas (Vivero, *et. al*, 2007). Esta proteína regula negativamente el fenotipo de invasión de *Salmonella* al formar el complejo represivo H-NS/Hha. Además, es capaz de formar el complejo Hha/YdgT para reprimir a los genes del regulón de SPI-2 en *Salmonella* (Olekhovich y Kadner, 2007; Silphaduang, *et. al*, 2007).

El que no se haya observado represión por Hha en los genes analizados en *E. coli*, podría deberse a que en *Salmonella* existen otros factores indispensables para que se de la represión por Hha.

Por otro lado, nuestros resultados también revelaron la existencia de reguladores transcripcionales específicos de *Salmonella*, aún no identificados, involucrados en la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2.

El hecho de que *hilD* se exprese 15 veces mas en *E. coli* que en la mutante de *S. Typhimurium* $\Delta hilD$ sugiere la existencia de un regulador específico de *Salmonella* que mantiene reprimida la expresión de *hilD* en esta mutante. En *E. coli* no se requiere la presencia de HilD (este estudio) o de UvrY, el homólogo de SirA presente en *E. coli*, para la expresión de *hilD*. Nosotros proponemos que HilD y SirA inducen la expresión máxima de *hilD* al contrarrestar la represión que ejerce el regulador específico de *Salmonella* (Fig. 21).

Por otro lado, el grupo del Dr. José Luis Puente encontró que HilD, además de iniciar la cascada reguladora de SPI-1, se requiere también para la expresión del sistema de dos componentes SsrA/B de SPI-2, cuando *Salmonella* crece en LB. Además, se demostró que en estas condiciones de crecimiento HilD antagoniza la función represora que ejerce H-NS sobre el operón *ssrA/B*, mecanismo similar al que sigue HilD para inducir la expresión de *hilA* (Bustamante, *et. al*, no publicado).

Sin embargo, en este trabajo encontramos que HilD no es capaz de inducir la expresión de *ssrAB* en *E. coli*. Así mismo, nuestros resultados indicaron que *ssrAB* no se expresa en un mutante *E. coli* Δhns , en presencia o no de HilD. En contraste, la presencia de HilD induce la expresión de *hilA* en *E. coli* y *hilA* se expresa en la mutante *E. coli* Δhns aún en ausencia de HilD. Estos resultados sugieren que la existencia de otro factor de *S. Typhimurium* que, junto con HilD, se requiere para la inducción de *ssrAB* y por consiguiente la expresión de los genes de SPI-2 (Fig. 26)

Nosotros proponemos que se requiere de la acción concertada de HilD, OmpR y otro regulador de *Salmonella* para inducir la expresión de *ssrAB*. HilD contrarrestaría la represión que ejerce H-NS y entonces OmpR y el otro probable regulador podrían activar la expresión de *ssrAB* (Fig. 32).

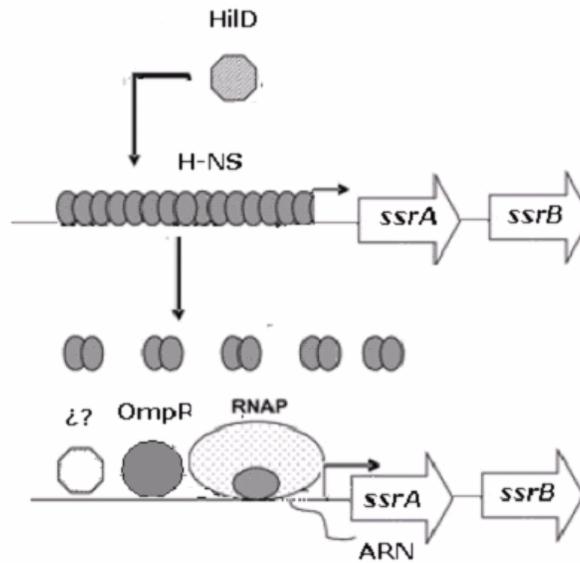


Figura 32. Modelo de la expresión del gen *ssrAB* de *S. Typhimurium*. Hild actúa como des-represor de *ssrAB* para posteriormente, el complejo de activación formado por OmpR y otra proteína de *S. Typhimurium*, induzcan la expresión de *ssrAB*.

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio aportan evidencias que permitirán entender mejor los mecanismos de regulación de la expresión de genes de virulencia en *Salmonella*. Las conclusiones más importantes son las siguientes:

- H-NS reprime directamente la expresión de *sirA* y *hilA*, que codifican para reguladores clave en la cascada de regulación de SPI-1.
- El regulador HilD contrarresta la represión de H-NS sobre *hilA*, actuando principalmente como un des-represor. Los otros reguladores codificados en SPI-1, HilA e InvF, actúan como activadores clásicos para inducir la expresión de los genes de SPI-1.
- La expresión transcripcional de *hilD* requiere de la acción conjunta de los reguladores HilD y SirA, lo cual probablemente contrarreste la represión mediada por otro regulador de *Salmonella* (Fig.33).

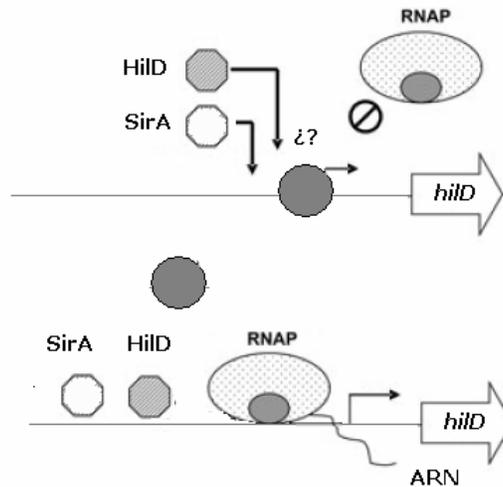


Figura 33: Modelo de la expresión del gen *hilD* de *S. Typhimurium*. HilD y SirA forman un complejo de activación sobre el promotor de *hilD*, lo cual contrarresta la represión mediada por un regulador exclusivo de *Salmonella*.

- H-NS reprime directamente a los genes *ssaG* y *pipB* del regulón de SPI-2.
- El regulador de respuesta SsrB contrarresta la represión que ejerce H-NS sobre *ssaG* y *pipB*. Además, SsrB parece tener una función dual, que podría actuar como des-represor y activador clásico de la transcripción. (Fig. 34).

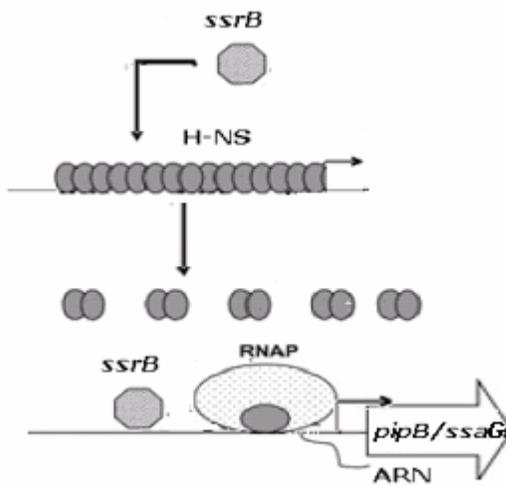


Figura 34: Modelo de la regulación de los genes *pipB* y *ssaG* de *S. Typhimurium*. SsrB contrarresta la represión que ejerce H-NS sobre los genes *pipB* y *ssaG*, pero también se requiere para la activación de estos genes.

- La expresión transcripcional del operón *ssrA/B* requiere de la acción conjunta de HilD, OmpR y otro factor específico de *S. Typhimurium* (Fig.35).

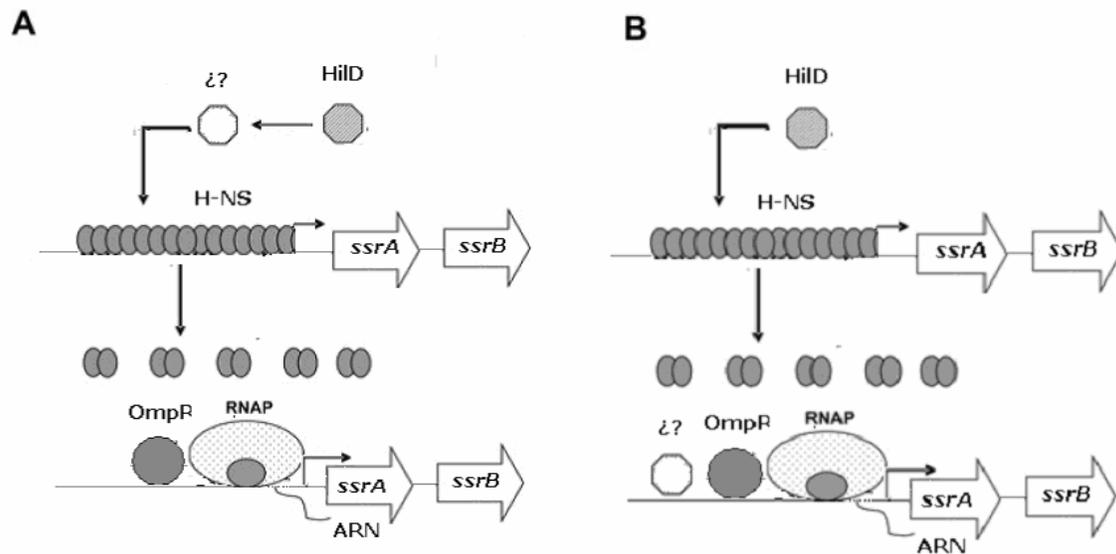


Figura 35: Modelo de la expresión del gen *ssrAB* de *S. Typhimurium*.

- A. HilD actúa sobre un segundo regulador de la transcripción, el cual actúa como des-represor y forma un complejo de activación con OmpR.
- B. HilD actúa como des-represor de *ssrAB* para posteriormente, el complejo de activación formado por OmpR y otra proteína de *S. Typhimurium*, induzcan la expresión de *ssrAB*.

IX. PERSPECTIVAS

Para localizar los sitios de unión de H-NS sobre la región reguladora de *sirA*, *hilA*, *ssrAB*, *ssaG* y *pipB* se requiere la realización de experimentos de interacción proteína/ADN, como geles de retardamiento (EMSAs, “Electrophoretic Mobility Shift assays”) y ensayos de protección a la enzima DNAsa (“footprinting”). Así mismo, experimentos de geles de retardamiento en los que se ponga a competir a los reguladores HilD o SsrB con H-NS, por la unión a la región reguladora de sus genes blanco, ayudarán a definir si HilD y SsrB desplazan a H-NS y de esta manera contrarrestan la represión de esta proteína.

La identificación de los posibles reguladores transcripcionales que se requieren para la inducción de *ssrAB* y para la represión de *hilD* en *Salmonella*, como lo sugiere este estudio, podría determinarse mediante mutagénesis al azar por transposones del genoma de *Salmonella*. Por ejemplo, buscando mutantes que ya no expresen a la fusión *ssrAB-cat* en la cepa silvestre de *S. Typhimurium*, o mutantes en las que se incremente la expresión de la fusión *hilD-cat* en la cepa *S. Typhimurium ΔhilD*.

X. REFERENCIAS

1. Haraga, A., Ohlson M. B. y Miller S. I. *Salmonellae interplay with host cells*. Nature. **6**, 53-66 (2008).
2. Su, LH. y Chiu, CH. *Salmonella: Clinical Importance and Evolution of Nomenclature*. Chang Gung Medical Journal. **30**, 210-219 (2007).
3. Marcus, S. L., Brumell J. H., Pfeifer C. G., Finlay B. *Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages*. Microbes and Infection. **2**, 145-156 (2000)
4. Wester, I. H. y Hensel M. *Salmonella pathogenicity islands encoding type III secretion systems*. Microbes and Infection. **3**, 549-559 (2001).
5. Jepson, M. A. y Clark, M. A. *The role of M cells in Salmonella infection*. Microbes and Infection. **3**, 1183-1190 (2001).
6. Figueroa, I. M. y Verdugo, A. *Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp.* Revista Latinoamericana de Microbiología. **47**, 25-42 (2005).
7. García-del Portillo, F. *Salmonella intracellular proliferation: where, when and how?* Microbes and Infection. **3**, 1305-1311 (2001).
8. Hautefort, I., Thompson, A., Eriksson-Ygberg, S., Parker, M.L., Lucchini, S., Danino, V., Bongaerts, R.J., Ahmad, N., Rhen, M. y Hinton, J.C. *During infection of epithelial cells Salmonella enterica serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three Type 3 Secretion Systems*. Cellular Microbiology (2007).
9. Bowe, F., Lipps, C. J., Tsolis, R., Groisman, E., Heffron, F. y Kusters, J. G. *At Least Four Percent of the Salmonella Typhimurium Genome Is Required for Fatal Infection of Mice*. Infection and Immunity. **66**, 3372-3377 (1998).
10. Navarre, W. W., McClelland, M., Lobby, S. J. y Fang F. C. *Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA*. Genes & Development. **21**, 1456-1471 (2007).

11. Gerlach, R. G., Jäckel, D., Geymeier, N. y Hensel, M. *Salmonella Pathogenicity Island 4-Mediated Adhesion Is Coregulated with Invasion Genes in Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*. **75**, 4697- 4709 (2007).
12. Zhou, D. y Galán, J. *Salmonella entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins*. *Microbes and Infection*. **3**, 1293-1298 (2001).
13. Cornelis, G. R. *The type III secretion injectisome*. *Nature reviews. Microbiology*. **4**, 811-825 (2006).
14. Cornelis, G. R y Van Gijsegem, F. *Assembly and function of type III secretory systems*. *Microbiology*. **54**, 735-774 (2000).
15. Komoriya, K., Shibano, N., Higano, T., Azuma, N., Yamaguchi, S. y Aizawa, S. *Flagellar proteins and type III-exported virulence factors are the predominant proteins secreted into the culture media of Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*. **34**, 767-779 (1999).
16. Schlumberger, M. C., Hardt, W-D. *Salmonella type III secretion effectors: pulling the host cell's strings*. *Science*. **9**, 46-54 (2006).
17. Patel, J. C. y Galán J. E. *Manipulation of the host actin cytoskeleton by Salmonella – all in the name of entry*. *Science*. **8**, 10-15 (2005).
18. Patel, J. C. y Galán, J. E. *Differential activation and function of Rho GTPases during Salmonella-host cell interactions*. *Journal of Cell Biology*. **175**, 453-463 (2006).
19. Marcus, S. L., Knodler, L. A. y Finlay, B. B. *Salmonella enterica serovar Typhimurium effector SigD/SopB is membrane-associated and ubiquitinated inside host cells*. *Cellular Microbiology*. **4**, 435-446 (2002).
20. Raffatellu, M., Wilson, R. P., Chessa, D., Andrews-Polymenis, H., Tran, Q. T., Lawhon, S., Khare, Sangeeta., Adams, L. G. y Bäumlér, A. J. *SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 Contribute to Salmonella enterica Serotype Typhimurium Invasion of Epithelial Cells*. *Infection and Immunity*. **73**, 146-154 (2005).

21. Hensel, M. *Salmonella pathogenicity island 2*. *Molecular Microbiology*. **36**, 1015-1023 (2000).
22. Duong, N., Osborne, S., Bustamante, V. H., Tomljenovic, A. M., Puente, J. L. y Coombes, B. K. *Thermosensing Coordinates a Cis-regulatory Module for Transcriptional Activation of the Intracellular Virulence System in Salmonella enterica Serovar Typhimurium*. *The Journal of Biological Chemistry*. **282**, 34077-34084 (2007).
23. Waterman, S. R y Holden D. W. *Functions and effectors of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system*. *Cellular Microbiology*. **5**, 501-511 (2003).
24. Knodler, L. A., Vallance, B. A., Hensel, M., Jäckel, D., Finlay, B. B. y Steele-Mortimer, O. *Salmonella type III effectors PipB and PipB2 are targeted to detergent-resistant microdomains on internal host cell membranes*. *Molecular Microbiology*. **49**, 685-704 (2003).
25. Jones, B. D. *Salmonella Invasion Gene Regulation: A Story of Environmental Awareness*. *Microbiology*. **43**, 110-117 (2005).
26. Altier, C. *Genetic and Environmental Control of Salmonella Invasion*. *Microbiology*. **43**, 85-92 (2005).
27. Papezova, K., Gregorova, D., Jonuschies, J. y Rychlik, I. *Ordered expression of virulence genes in Salmonella enterica serovar typhimurium*. *Folia Microbiologica*. **52**, 107-114 (2007).
28. Ellermeier, J. R. y Slauch, J. M. *Fur Regulates Expression of the Salmonella Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System through HilD*. *Journal of Bacteriology*. **190**, 476-486 (2008).
29. Bader, M. W., Navarre, W. W., Shiau, W., Nikaido, H., Frye, J. G., McClelland, M., Fang, F. C. y Miller, S. I. *Regulation of Salmonella typhimurium virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides*. *Molecular Microbiology*. **50**, 219-230 (2003).
30. Bustamante, V. H., Martínez, L. C., Santana, F. J., Knodler, L. A., Steele-Mortimer, O. y Puente, J. L. *HilD-mediated transcriptional crosstalk*

- between the two major Salmonella pathogenicity islands SPI-1 and SPI-2.* Sometido a la revista Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America (PNAS).
31. Bispham, J., Tripathi, B. N., Watson, P. R. y Wallis, T. S. *Salmonella pathogenicity island 2 influences both systemic salmonellosis and Salmonella-induced enteritis in calves.* Infection and Immunity. **69**, 367-377 (2001).
 32. Coburn, B., Li, Y., Owen, D., Vallance, B. A. y Finlay, B. B. *Salmonella enterica serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis.* Infection and Immunity. **73**, 3219-3227 (2005).
 33. Coombes, B. K., Coburn, B. A., Potter, A. A., Gomis, S., Mirakhur, K., Li, Y. y Finlay, B. B. *Analysis of the contribution of Salmonella pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine ileal loop model and a murine model of infectious enterocolitis.* Infection and Immunity. **73**, 7161-7169 (2005).
 34. Jones, M. A., Hulme, S. D., Barrow, P. A. y Wigley, P. *The Salmonella pathogenicity island 1 and Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of Salmonella enterica serovar Typhimurium in the chicken.* Avian Pathology. **36**, 199-203 (2007).
 35. Brown, N. F., Vallance, B. A., Coombes, B. K., Valdez, Y., Coburn, B. A. y Finlay, B. B. *Salmonella pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine.* PLoS Pathogens. **1**, 252-258 (2005).
 36. Ellermeier, C. D., Ellermeier, J. R. y Slauch, J. M. *HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI-1 type three secretion system regulator hilA in Salmonella enterica serovar Typhimurium.* Molecular Microbiology. **57**, 691-705 (2005).
 37. Boddicker, J. D., Knosp, B. M. y Jones, B. D. *Transcription of the Salmonella Invasion Gene Activator, hilA, Requires HilD Activation in the*

- Absence of Negative Regulators*. Journal of Bacteriology. **185**, 525-533 (2003).
38. Schechter, L. M. y Lee, C. A. *AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the Salmonella typhimurium hilA promoter*. Molecular Microbiology. **40**, 1289-1299 (2001).
39. Olekhovich, I. N. y Kadner, R. J. *Crucial roles of both flanking sequences in silencing of the hilA promoter in Salmonella enterica*. Journal of Molecular Biology. **357**, 373-386 (2006).
40. Altier, C., Suyemoto, M., Ruiz, A. I., Burnham, K. D y Maurer, R. *Characterization of two novel regulatory genes affecting Salmonella invasion gene expression*. Molecular Microbiology. **35**, 635-646 (2000).
41. Olekhovich, I. N. y Kadner, R. J. *Role of Nucleoid-Associated Proteins Hha and H-NS in Expression of Salmonella enterica activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion*. Journal of Bacteriology. **189**, 6882-6890 (2007).
42. Baxter, M. A y Jones, B. D. *The fimYZ genes regulate Salmonella enterica Serovar Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility*. Infection and Immunity. **73**, 1377-1385 (2005).
43. Baxter MA, Fahlen TF, Wilson RL, Jones BD. *HilE interacts with HilD and negatively regulates hilA transcription and expression of the Salmonella enterica serovar Typhimurium invasive phenotype*. Infection and Immunity. **71**, 1295-1305 (2003).
44. Dongxia, Lin., Rao, C. V. y Slauch, J. M. *The Salmonella SPII Type Three Secretion System Responds to Periplasmic Disulfide Bond Status via the Flagellar Apparatus and the RcsCDB System*. Journal of Bacteriology. **190**, 87-97 (2007).
45. Walthers, D., Carroll, R. K., Navarre, W. W., Libby, S. J., Fang, F. C. y Kenney, L. J. *The response regulator SsrB activates expression of diverse Salmonella pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the*

- nucleoid-associated protein H-NS*. *Molecular Microbiology*. **65**, 477-493 (2007).
46. Lee, A. K., Detweiler, C. S. y Falkow, S. *OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in Salmonella pathogenicity island 2*. *Journal of Bacteriology*. **182**, 771-781 (2000).
47. Feng, X., Oropeza, R. y Kenney, L. J. *Dual regulation by phospho-OmpR of ssrA/B gene expression in Salmonella pathogenicity island 2*. *Molecular Microbiology*. **48**, 1131-1143 (2003).
- Dorman, C., J. *H-NS, the genome sentinel*. *Nature reviews. Microbiology*. **5**, 17-21 (2006).
48. De la Cruz, M., Fernández-Mora, M., Guadarrama, C., Flores-Valdez, M. A., Bustamante, V. H., Vázquez A. y Calva, E. *LeuO antagonizes H-NS and StpA- dependent repression in Salmonella enterica ompS1*. *Molecular Microbiology*. **66**, 727-743 (2007).
49. Vivero, A., Baños, R. C., Mariscotti, J. F., Oliveros, J. C., García del Portillo, F., Juárez, A. y Madrid, C. *Modulation of horizontally-acquired genes by the Hha-YdgT proteins in Salmonella enterica Serovar Typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. **190**, 1152-1156 (2007).
50. Stella, S., Spurio, R., Falconi, M., Pon, C. L y Gualerzi, C. O. *Environmental control of the In vivo oligomerization of nucleoid protein H-NS*. *Journal of Molecular Biology*. **355**, 169-174 (2006).
51. Dorman, C., J. *H-NS: a universal regulator for a dynamic genome*. *Nature reviews. Microbiology*. **2**, 391-400 (2004).
52. Silphaduang, U., Mascarenhas, M., Karmali, M. y Coombes, B. K. *Repression of intracellular virulence factors in Salmonella by the Hha and YdgT nucleoid-associated proteins*. *Journal of Bacteriology*. **189**, 3669-3673 (2007).
53. Müller, C. M., Dobrindt, U., Nagy, G., Emödy, L., Uhlin, B. E. y Hacker, J. *Role of Histone-like proteins H-NS and StpA in expression of virulence determinants of Uropathogenic Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **188**, 5428-5438 (2006).

54. Rimsky, S. *Structure of the histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome superstructure*. Elsevier. **7**, 109-114 (2004).
55. Stella, S., Spurio, R., Falconi, M., Pon, C. L y Gualerzi, C. O. *Nature and mechanism of the in vivo oligomerization of nucleoid protein H-NS*. EMBO J. **24**, 2896-2904 (2005).
56. Dorman, Ch. J. *Probing bacterial nucleoid structure with optical tweezers*. BioEssays. **29**, 212-216 (2007).
57. Bouffartigues, E., Buckle, M., Badaut, C., Travers, A. y Rimsky, S. *H-NS cooperative binding to high-affinity sites in a regulatory element results in transcriptional silencing*. Nature Structural & Molecular Biology. **14**, 441-448 (2007).
58. Fahlen, T. F., Wilson, R. L., Boddicker, J. D. y Jones, B. D. *Hha is a negative modulator of transcription of hlaA, the Salmonella enterica Serovar Typhimurium invasion gene transcriptional activator*. Journal of Bacteriology. **183**, 6620-6629 (2001).
59. Lucchini, S., Rowley, G., Goldberg, M. D., Hurd, D., Harrison, M. y Hinton, J. C. *H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria*. PLoS pathogens. **2**, 746-752 (2006).
60. Bustamante, V. H., Santana, F. J., Calva, E. y Puente, J. L. *Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic Escherichia coli: Ler antagonizes H-NS-dependent repression*. Molecular Microbiology. **39**, 664-678 (2001).
61. Haack, K. R., Robinson, C. L., Miller, K. J., Fowlkes, J. W. y Mellies, J. L. *Interaction of Ler at the LEE5 (tir) operon of enteropathogenic Escherichia coli*. Infection and immunity. **71**, 384-392 (2003).
62. Barba, J., Bustamante, V.H., Flores-Valdez, M. A., Deng, W., Finlay, B. B. y Puente, J. L. *A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA*. Journal of Bacteriology. **187**, 7918-7930 (2005).

63. Gauthier, A., Robertson, M. L., Lowden, M., Ibarra, J. A., Puente, J. L. y Finlay, B. B. *Transcriptional Inhibitor of Virulence Factors in Enteropathogenic Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**, 4101-4109 (2005).
64. Heroven, A. K., Nagel, G., Tran, H. J., Parr, S. y Dersch, P. *RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and rovA expression in Yersinia pseudotuberculosis*. *Molecular Microbiology*. **53**, 871-888 (2004).