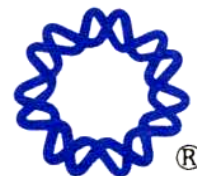




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

T E S I S

**Análisis transcripcional del sistema CRISPR/Cas en *Salmonella*
enterica serovar Typhi**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

QFB. Liliana Medina Aparicio

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Ismael Hernández Lucas

CUERNAVACA, MOR., JUNIO DE 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente proyecto se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología (UNAM), bajo la asesoría del Dr. Ismael Hernández Lucas.

El Comité tutorial estuvo integrado por:

Dra. Katy Juárez López

Dr. Juan Miranda Ríos

Dr. Miguel Ángel Ramírez Romero

Dr. Ismael Hernández Lucas

Jurado designado para el examen de grado:

Dr. Mario Soberón Chávez

Dr. Daniel Genaro Segura González

Dr. Dimitris Georgellis

Dr. Juan Enrique Morett Sánchez

Dr. Ismael Hernández Lucas

Esta investigación se llevo a cabo gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, No. 89337 y No. 127298) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA/UNAM, IN214808).

La alumna recibió beca CONACYT (No. CVU/Becario: 215141/220853) y beca otorgada por la Unidad de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México en la modalidad de Fomento a la Graduación para la realización de esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por apoyar siempre mi formación profesional, por su cariño incondicional, por sus oraciones y su cobijo a pesar de la distancia, porque en este camino hemos crecido los tres y mis logros son suyos.

A mis hermanos Vicente y Ramón, por creer en mí y cuidarme, porque ustedes son mi inspiración para ser mejor persona.

Al resto de mi familia, por siempre estar conmigo estar, brindarme un abrazo y darme palabras de aliento.

A Ross, por iniciar y terminar este camino conmigo, por tu paciencia y nunca abandonarme aun en la más dura batalla.

A Sarita, Cess, Ale y Bere, por adoptarme en sus vidas, por su increíble sinceridad y su genuina alegría, gracias amigas por no dejarme caer cuando estaba tropezando.

Al Dr. Ismael, por su apoyo, confianza y enorme paciencia, por procurar mi desarrollo profesional y personal.

A Ana Lucía, Javier Esteban y José Miguel, por ser unos amigos invaluable, porque sus consejos, ayuda y apoyo fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

A Sergio y Lorena por la ayuda brindada para la realización de este proyecto, por su empeño y dedicación.

A los miembros del laboratorio Calva/Puente: Magdis, Claudia, Carmen G., Mike, Richard, Noé, Marcos, Ismael S., Adrián, Panchito, Javier O., Vero, Ale Vázquez,

Víctor B., Luary, Paola, Sara Betania, Rafa, Enrique, Eduardo, Victor Antonio, Aurora, Abraham, Cristina, Alex, Rosalva G., Amapola, Elvira, Héctor, Miguel T., Dr. José Luis Puente, por hacer que cada jornada se volviera más amena con sus risas y charlas, por sus consejos y ayuda, pero sobre todo por su amistad.

Al Dr. Edmundo Calva por sus consejos y estar atento de mi desarrollo profesional.

A José Augusto Ramírez Trujillo, Rosa María Gutiérrez Ríos, Heladia Salgado Osorio, Leticia Olvera Rodríguez y Jesús Caballero Mellado, por su valiosa contribución laboral a este proyecto.

A mi comité tutorial: Dr. Juan Miranda Ríos, Dra. Katy Juárez López y Dr. Miguel Ángel Ramírez Romero por su atención y aportaciones críticas durante el desarrollo de este estudio.

Al jurado de examen: Dr. Mario Soberón Chávez, Dr. Daniel G. Segura González, Dr. Dimitris Georgellis y Dr. Enrique Morett Sánchez por los valiosos comentarios y sugerencias para mejorar la redacción y presentación de este escrito.

A todos mis amigos, por interesarse en mí y siempre animarme.

ÍNDICE

	Página
1. ABREVIATURAS	1
2. RESUMEN	3
3. INTRODUCCIÓN	
3.1 <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	4
3.2 Patogénesis de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	4
3.3 Proteínas asociadas al nucleoide implicadas en virulencia	8
3.3.1 LRP	10
3.3.2 H-NS	12
3.4 Reguladores tipo LysR involucrados en virulencia	14
3.4.1 LeuO	17
3.4.1.1 El regulón LeuO en <i>Salmonella</i>	18
3.5 El sistema inmune CRISPR/Cas	19
4. ANTECEDENTES	
4.1 Regulación transcripcional del sistema CRISPR/Cas de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi IMSS-1	26
5. JUSTIFICACIÓN	30
6. HIPÓTESIS	31
7. OBJETIVO GENERAL	31
8. OBJETIVOS PARTICULARES	31
9. RESULTADOS	32
10. DISCUSIÓN	45
11. CONCLUSIONES	48

	Página
12. PERSPECTIVAS	49
13. MATERIALES Y MÉTODOS	
13.1 Cepas bacterianas utilizadas en este estudio	51
13.2 Plásmidos utilizados en este trabajo	52
13.3 Oligonucleótidos utilizados en este estudio	55
13.4 Construcción de fusiones transcripcionales al gen reportero <i>cat</i>	56
13.5 Mutagénesis sitio dirigida	57
13.6 Ensayos de actividad específica de CAT en medio nutritivo	58
13.7 Ensayos de actividad específica de CAT en medio mínimo	59
13.8 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)	59
13.9 Northern blot	60
13.10 Generación de mutantes por recombinación homóloga	61
13.11 Purificación de H-NS y LRP	61
13.12 Ensayos de retardamiento en gel	
13.12.1 EMSA H-NS	62
13.12.2 EMSA LRP	63
14. BIBLIOGRAFÍA	64

1. ABREVIATURAS

ArcA	Proteína reguladora de la respiración anaeróbica (regulador de respuesta)
ArcB	Proteína controladora de la respiración anaeróbica (sensor)
CAMPs	Péptidos catiónicos antimicrobianos
Cas	Proteínas asociadas a CRISPR
CAT	Cloranfenicol acetiltransferasa
CRISPR	Cluster de secuencias repetidas palindrómicas cortas interespaciadas regularmente
crRNA	RNA derivado de CRISPR
CysB	Regulador de implicado en la biosíntesis de cisteína
EnvZ	Proteína sensora de respuesta a osmolaridad
Fis	Factor de estimulación para la recombinación por inversión
Fnr	Proteína reguladora de la reducción de fumarato y nitrato
Hil	Genes involucrados en la regulación de la invasión (A, C, D, E)
H-NS	Proteína termoestable implicada en la estructuración del nucleóide
Hrg	Regulador de respuesta a peróxido de hidrógeno
HU	Proteína nucleóide sensible a temperatura
IHF	Factor de integración del hospedero
<i>ilvIH</i>	Operón involucrado en la biosíntesis de isoleucina-valina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
<i>leu</i>	Genes implicados en la biosíntesis de leucina
LeuO	Regulador global perteneciente a la familia LysR
LPS	Lipopolisacárido

LRP	Proteína reguladora de respuesta a leucina
LTTR	Regulador transcripcional tipo LysR
LysR	Regulador de la síntesis de lisina
MetR	Activador de genes implicados en la síntesis de metionina
NahR	Regulador del catabolismo de naftaleno
NarP	Proteína reguladora en respuesta a la concentración de nitrato/nitrito
NodD	Regulador involucrado en el proceso de nodulación
OD	Densidad Óptica
OmpR	Regulador de respuesta a osmolaridad
ORF	Marco de lectura abierta
OxyR	Regulador de la respuesta a estrés oxidativo
PAM	Motivo adyacente a proto-espaciador
PhoP	Regulador de respuesta a la concentración de fosfatos
PhoQ	Proteína sensora en respuesta a la concentración de fosfatos
RpoS	Factor sigma de fase estacionaria
SsrA	Cinasa sensora para la regulación del sistema de secreción tipo III
SsrB	Regulador del sistema de secreción tipo III
StpA	Proteína asociada al nucleoide paróloga de H-NS (Suprime el fenotipo td')

2. RESUMEN

Las bacterias y arqueas han desarrollado diversos sistemas para contender con la invasión de material genético externo. En los últimos años se ha descrito un novedoso sistema de defensa denominado CRISPR/Cas. Este programa genético es capaz de integrar un fragmento del DNA extraño dentro del cluster CRISPR, el cual se transcribe generando pequeños RNAs que guían al complejo enzimático Cas hacia el DNA invasor degradándolo, de este modo, el sistema CRISPR/Cas provee inmunidad específica. En este proyecto, se caracterizó la organización transcripcional y diversos elementos implicados en el control genético del sistema CRISPR/Cas en *Salmonella enterica* serovar Typhi. Nuestros resultados demuestran que los genes *cas* junto con las secuencias CRISPR conforman un operón dependiente de LeuO. Adicionalmente, se determinó que la proteína asociada al nucleóide H-NS y la proteína reguladora de respuesta a leucina (LRP), actúan como represores del locus CRISPR/Cas. Ambos reguladores se unen en regiones corriente arriba y corriente abajo respecto al inicio de transcripción de *casA*. Finalmente, se determinó la expresión transcripcional del cluster CRISPR/Cas en condiciones de estrés (medio mínimo N), la cual es independiente de LeuO, sugiriendo que este conjunto de genes podría estar implicado en alguna función diferente a la defensa contra DNA foráneo. Los datos de este proyecto demuestran que existen múltiples moduladores involucrados en la regulación del sistema inmune CRISPR/Cas en *S. enterica* Typhi.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 *Salmonella enterica* serovar Typhi

El género *Salmonella*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, se clasifica en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. *S. enterica* se divide a su vez en 6 subespecies: *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica*, *houtenae* y *enterica* (Le Minor y Popoff, 1987; Reeves *et al.*, 1989), siendo ésta última la más estudiada y de la cual se han encontrado más de 2500 serovariedades capaces de infectar un gran número de aves, réptiles y mamíferos, incluyendo al humano.

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. enterica* Typhi) es un patógeno de humanos, que provoca fiebre tifoidea, enfermedad que se caracteriza por dolor de cabeza, pérdida del apetito, fiebre y molestia general. Cada año se presentan alrededor de 16 - 33 millones de casos de fiebre tifoidea a nivel mundial, de los cuales, aproximadamente, 216 000 pacientes pierden la vida (Crumb *et al.*, 2004). Por lo tanto, esta enfermedad representa un grave problema de salud, principalmente, en los continentes Asiático, Africano y Americano (Kothari *et al.*, 2008). Debido a lo anterior, y a la predominancia de cepas resistentes a los antibióticos utilizados en el tratamiento de la fiebre tifoidea (cloranfenicol, ampicilina, fluoroquinolonas, cefalosporinas, ácido nalidíxico, entre otros; Mirza *et al.*, 1996), la fabricación de vacunas capaces de inducir una respuesta inmune eficaz es un paso crítico en la erradicación de ésta enfermedad.

3.2 Patogénesis de *Salmonella enterica* serovar Typhi

El ciclo de infección de *Salmonella enterica* serovar Typhi inicia vía oral con la ingestión de alimentos contaminados. La dosis requerida para provocar fiebre tifoidea varía de 10^3 a 10^6 bacterias y el periodo de incubación, generalmente, es de dos semanas (Hornik *et al.*, 1970). Dentro del hospedero, *Salmonella* pasa directamente al estómago, lugar donde el pH ácido induce la expresión de genes bacterianos implicados en el mantenimiento y estructura de la superficie celular.

Los regulones controlados por RpoS, PhoPQ y EnvZ/OmpR permiten la adaptación de *Salmonella* al ambiente ácido (Rychlik y Barrow, 2005) y preparan a la bacteria para enfrentar las condiciones ambientales subsecuentes.

Cuando el patógeno abandona el estómago, está expuesto a diferentes condiciones de estrés presentes en el intestino delgado, incluyendo incremento en la presión osmótica, decremento en la concentración de oxígeno y presencia de moléculas dañinas como la bilis y bacteriocinas (Rychlik y Barrow 2005); sin embargo, *Salmonella* ha desarrollado diferentes mecanismos para contender con estos ambientes adversos.

Por ejemplo, bajo condiciones de alta presión osmótica, *S. enterica* Typhi es capaz de mantener la turgencia celular al incrementar la captación de potasio (Sutherland *et al.*, 1986) y remplazar a la proteína de membrana externa OmpF por OmpC, la cual forma poros de diámetro menor, disminuyendo la entrada de solutos hacia periplasma; este evento es controlado por la proteína sensora EnvZ y el regulador de respuesta OmpR (Graeme-Cook, *et al.*, 1989). Por otra parte, el principal mecanismo de defensa de *Salmonella* contra la acción de las sales biliares, el colesterol y la bilirrubina, consiste en impedir su paso a través de la membrana externa, para lo cual modifica el lípido A (Guo *et al.*, 1997) y expresa los genes *tolR* y *wec* que codifican para una proteína de membrana externa y un glicolípido respectivamente, implicados en preservar la integridad de la membrana (Rychlik y Barrow 2005).

A medida que *Salmonella* pasa a través del intestino la disponibilidad de oxígeno va disminuyendo, el bacilo es capaz de adaptarse a condiciones anaeróbicas gracias a los regulones dependientes de ArcAB y Fnr (Unden *et al.*, 1995). ArcAB suprime la expresión de las enzimas involucradas en el ciclo de Krebs, disminuyendo la producción de radicales de oxígeno y preservando las fuentes endógenas de energía; este sistema de dos componentes también es responsable de la inducción de *cydAB* (citocromo d oxidasa) involucrada en la respiración bajo condiciones limitadas de O₂ (Nystrom *et al.*, 1996).

S. enterica Typhi sobrevive el pH ácido del estómago y contiente con las condiciones adversas del intestino delgado, posteriormente, procede a invadir las células epiteliales, las cuales están protegidas por péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMP; Rychlik y Barrow, 2005). Los CAMP son producidos en respuesta a la infección microbiana, interaccionan con el LPS (Lipopolisacárido) y se insertan en la bicapa lipídica formando canales que generan una disminución del potencial de membrana y con ello la muerte del patógeno (Zhang *et al.*, 2001). La respuesta de *Salmonella* a la presencia de los CAMP reside en la modificación del lípido A con el fin de evitar el anclaje de los péptidos y evitar la formación de poros (Guo *et al.*, 1997). Entre los genes involucrados en este proceso se encuentran *pmrAB* (sistema de dos componentes implicado en la resistencia a polimixina), *pmrHFJKL* (operón necesario para la biosíntesis de aminoarabinosa), *pagP* (proteína de membrana externa involucrada en la biosíntesis del lípido A), *pgtE* (proteasa E) y *pagL* (deacilasa del lípidoA), los cuales son controlados por PhoPQ (Behlau y Miller 1993; Gunn *et al.*, 1998).

Después de evadir la acción de los péptidos catiónicos antimicrobianos, el patógeno se adhiere, a través de fimbrias, a las células epiteliales del íleon y a las células M de las placas de Peyer (Zhang *et al.*, 2000). La alta osmolaridad, pH alcalino y disminución en las concentraciones de oxígeno del lumen intestinal generan la activación del sistema de secreción tipo III y de proteínas efectoras codificadas en SPI-1 (Hansen-Wester y Hensel, 2001). El sistema de secreción tipo III junto con proteínas efectoras le permite a *Salmonella* invadir por un mecanismo conocido como “trigger” (Zhou y Galán, 2001; Figueroa y Verdugo, 2005). El sistema de secreción se ensambla, y a través de ésta jeringa molecular se traslocan los efectores bacterianos SipA y SipC los cuales interaccionan con la actina del hospedero alterando la organización del citoesqueleto (Zhang *et al.*, 2008). Otra molécula traslocada corresponde a SigD/SopB (fosfatidilinositol fosfatasa) encargada de promover la degradación de fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato, lo cual produce una remodelación del plasma de la célula hospedera dando lugar a la formación de ondulamiento (ruffling), evento que promueve la internalización bacteriana (Sánchez-Jiménez y Cardona-Castro, 2003).

Posteriormente, la proteína SptP (tirosin fosfatasa/GTPasa) del patógeno inactiva las proteínas Cdc42 y Rac1 del hospedero, con lo cual la célula eucariótica regresa a su estado morfológico inicial (Zhang *et al.*, 2008). La presencia de la cápsula Vi en *S. enterica* Typhi, reduce la producción de IL-8 (Interleucina 8) por parte de las células del epitelio intestinal, evitando así el reclutamiento de neutrófilos (Sharma y Qadri, 2004) y favoreciendo el proceso de colonización y diseminación de *Salmonella*.

Dentro de la célula huésped *Salmonella* produce efectos citotóxicos llevando a la destrucción de las células M (ulceración) y, por tanto, a la invasión de enterocitos adyacentes (Figuroa y Verdugo, 2005). Posteriormente, el patógeno es fagocitado por macrófagos, dentro de los cuales se alberga en vacuolas (*Salmonella* containing vacuole o SCV), éstas contienen concentraciones limitadas de Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} y pH ácido (Knodler y Steele-Mortimer, 2003) condiciones que provocan la activación de los genes codificados en la isla de patogenicidad 2 (Hansen-Wester y Hensel, 2001; Fass y Groisman, 2009) tales como el sistema de secreción tipo III, el cual le permite a la bacteria trasladar efectores (SseF, SseG) al citoplasma del macrófago, estos efectores son los encargados de evitar la acción de NADPH oxidasas y sintasas de óxido nítrico, inhibir la acumulación de colesterol y mantener la integridad de la SVC (Waterman y Holden, 2003). Otros genes codificados en la isla 2 como el sistema de reducción de tetratoato (*ttr*) son necesarios para contender con las condiciones anaeróbicas vacuolares (Lee *et al.*, 2000; Rychlik y Barrow 2005). El sistema de transporte de magnesio *mtgBC* localizado en SPI-3 y activado por PhoP (Blanc-Potard y Groisman, 1997) también juega un papel relevante en la sobrevivencia intracelular de *Salmonella*.

Otra estrategia utilizada por este patógeno para sobrevivir dentro de la célula fagocítica, consiste en inhibir la fusión de las SVC con el lisosoma (Buchmeier y Heffron, 1991). De esta manera, y después de un periodo de adaptación de 3-4 h, la bacteria es capaz de replicarse dentro del macrófago. Posteriormente, *S. enterica* Typhi induce la lisis de la célula eucarionte (Sánchez-

Jiménez y Cardona-Castro, 2003) y se disemina por torrente sanguíneo o mediante macrófagos no activados.

En sangre, la bacteria debe enfrentar la opsonización y lisis celular mediada por el complemento, el LPS y la proteína Rck son capaces de impedir la inserción del complejo de ataque a membrana (MAC) constituido por las unidades C5 a C9 del complemento (Frank *et al.*, 1987; Heffernan *et al.*, 1992). Además, la presencia de la cápsula Vi ayuda a enmascarar la superficie celular evitando la acción del complemento (Gulig, 1996).

Salmonella se alberga en bazo, hígado y médula ósea, nichos donde continua replicándose (Figuroa y Verdugo, 2005). Se puede presentar ruptura del bazo provocando la muerte del paciente por choque séptico ocasionado por el LPS, el cual estimula la liberación de agentes mediadores de la respuesta inmune como citocinas. El estadio de la infección puede durar de 2 a 3 semanas, durante las cuales se presenta fiebre de manera cíclica, acompañada de escalofríos, delirio y convulsiones (Calva, 2001).

La virulencia de las bacterias patógenas está determinada por elementos cromosomales y por la adquisición de plásmidos e islas de patogenicidad (SPI's). En *Salmonella enterica* serovar Typhi se han identificado 15 SPI's, de las cuales SPI-1 y SPI-2 han sido ampliamente caracterizadas (Osborne *et al.*, 2009). Otros elementos genéticos involucrados en virulencia son la familia de proteínas asociadas al nucleoide y los reguladores tipo LysR.

3.3 Proteínas asociadas al nucleoide implicadas en virulencia

La expresión genética necesaria, para que *Salmonella* pueda realizar su ciclo de infección, está controlada por diversos factores de transcripción, dentro de los cuales destacan las proteínas asociadas al nucleoide, cuya función celular consiste en compactar y estructurar el DNA. En bacterias Gram-negativas se han descrito 12 miembros de ésta familia, destacando: Fis (Factor for inversion

stimulation), HU (Heat-unstable protein), IHF (Integration host factor), LRP (Leucine-responsive regulatory protein), H-NS (Histone-like nucleoid-structuring protein) y su parálogo StpA (Dorman, 2004). Estas proteínas juegan un papel determinante en la formación del nucleoide y también participan en la regulación de la virulencia.

En *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Fis afecta el patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo de azúcares, síntesis de flagelos y de los activadores de la isla de patogenicidad 1 (SPI-1), *hilA* e *invF* (Yoon *et al.*, 2003). En el modelo del ratón, una cepa de *S. enterica* Typhimurium mutante en *fis* muestra un decremento en la virulencia cuando es administrada vía oral (Wilson *et al.*, 2001).

La proteína HU está constituida por dos subunidades HU α y HU β , codificadas por los genes *hupA* y *hupB*, respectivamente; éstas subunidades pueden formar homodímeros o heterodímeros (Dillon y Dorman, 2010). En *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, mutaciones en los genes *hupA* y *hupB* reducen la expresión de *hilA*, *hilC*, *hilD*, *ssrA* y *ssrB*, reguladores de los ORFs pertenecientes a SPI-1 y SPI-2, por lo tanto, una cepa de *S. enterica* Typhimurium carente de *hupA/hupB* disminuye su capacidad de invadir células epiteliales y de sobrevivir dentro de macrófagos (Mangan *et al.*, 2011).

En *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, experimentos de microarreglos han detectado la expresión de *ihf* en macrófagos de ratón, sugiriendo su participación en virulencia (Ericksson *et al.*, 2003). Además, IHF está involucrado en la activación de *spvR* (regulador del plásmido de virulencia de *Salmonella*). Se ha reportado que en *Escherichia coli* enteropatógena y enterohemorrágica IHF está involucrados en la regulación de proteínas de virulencia, tales como EspA, EspB, EspD (proteínas efectoras necesarias para la formación de las lesiones AE) y Tir (Receptor translocado de intimina; Rosenshine *et al.*, 2004).

StpA es postulada como una chaperona de RNA en *Escherichia coli* (Mayer *et al.*, 2007); sin embargo, tiene la capacidad de interactuar con DNA. Se ha propuesto que StpA actúa como sustituyente de H-NS. Su expresión se detecta sólo en ausencia de ésta última (Zhang *et al.*, 1996). La proteína StpA regula la expresión del 5% del genoma de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Dentro de los genes dependientes se encuentran los ORFs *mig-14*, *virK* y *ugtL*, necesarios para la resistencia al péptido catiónico polimixina B. Los genes *stdAB*, *safA* y *fimA*, implicados en la síntesis del pili, también son reprimidos por StpA (Lucchini *et al.*, 2009).

3.3.1 LRP

La Proteína reguladora de respuesta a leucina (LRP) es un regulador transcripcional básico (pl 9.2) de 18.8 kDa (Azam *et al.*, 1999) el cual participa en la estructuración del cromosoma bacteriano, así como en la regulación del metabolismo de aminoácidos. Puede actuar como represor o activador transcripcional (Brinkman *et al.*, 2003). Los niveles de expresión del gen *lrp* incrementan 3 a 4 veces cuando *E. coli* K12 se encuentra en medio mínimo. Además se ha demostrado que la concentración de LRP aumenta cuando la bacteria se encuentra en fase estacionaria (Landgraf *et al.*, 1996).

LRP es un regulador global, posee un dominio Hélice-Vuelta-Hélice en el N-terminal involucrado en la interacción con el DNA. El resultado de mutaciones realizadas en los aminoácidos 13, 34, 40, 41, 44, 46, 48, 61, 65 y 70 valida ésta aseveración (Figura 1) (Platko y Calvo, 1993). En el extremo Carboxilo contiene un dominio $\alpha\beta$ -sandwich conocido como RAM (dominio regulador del metabolismo de aminoácidos; Leonard *et al.*, 2000), implicado en el reconocimiento a leucina. Sustituciones realizadas entre los aminoácidos 108 y 149 impiden a LRP responder a la presencia de este aminoácido (Figura 1) (Platko y Calvo, 1993). Mutaciones en el C-terminal y en la zona central de LRP revelan la participación de estas regiones en la activación transcripcional de diversos genes blanco tales como *ilvIH* (Figura 1) (Platko y Calvo, 1993).

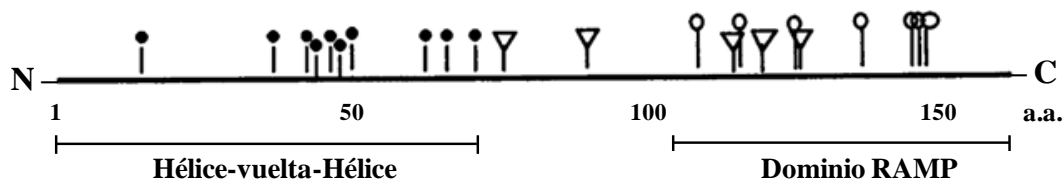


Figura 1. Organización estructural del regulador global LRP. Los símbolos representan mutaciones que afectan la capacidad de LRP para unirse al DNA (●) (D13Y, L34P, L40F, S41P, P44T, L46P, R48C, Y61H, L65P y L70P); responder a la presencia de Leucina (◐) (L108F, D114E, M124R, L136R, Y147H, V148F y V149A); activar la transcripción (▽) (V76A, P90L, F113L, T119L y S125P). Los números indican la posición de los aminoácidos (Tomada de Calvo y Matthews, 1994).

LRP se une a diferentes sitios de la región reguladora de *ilvIH*, con esta información se propuso AgaATTTTATtcT como una secuencia consenso para este regulador transcripcional (Wang y Calvo, 1993). Rex y colaboradores (1991) mediante un análisis computacional de 11 sitios de unión para LRP (4 de *ilvIH*, 2 de *lysU* y uno de *tdh*, *sdaA*, *oppA*, *oppBDCF*, *livJ* y *livKHMGF*) sugieren también la secuencia TTTATTCtNaAT como sitio de reconocimiento. En el 2009, Baek *et al.*, al realizar un análisis bioinformático de todas las zonas de reconocimiento por LRP reportados en *E. coli* y *Salmonella* proponen un consenso similar a los descritos anteriormente YRGHWW(G)DTTDWDSYR, donde Y = C o T; R = A o G; H = A, T o C; W = A o T; (G) puede estar ausente; D = A, T o G; y, S = G o C; es evidente que esta proteína reconoce regiones ricas en A + T. No obstante, Brinkman y colaboradores (2003) sugieren que el reconocimiento de nucleótidos específicos ubicados en cierta posición es importante, y no el de una secuencia determinada por parte de LRP.

Adicionalmente, se ha observado que el aminoácido leucina interacciona con LRP induciendo regulación positiva o negativa. En algunos casos, la presencia de este aminoácido inhibe la interacción de LRP con el DNA (Pul *et al.*, 2005). Leucina también puede aumentar la afinidad de LRP por sus sitios de unión, como sucede en el promotor *invF* de *S. enterica* Typhimurium (Baek *et al.*, 2009). Utilizando geles de dos dimensiones, Ernsting y su grupo de trabajo (1992)

identificaron a las proteínas de membrana externa OmpC, OmpF así como glutamino sintetasa (GlnA) y la subunidad menor de glutamato sintasa (GltD) como parte del regulón LRP; en estos casos la regulación es independiente de leucina.

En *Escherichia coli*, LRP controla la expresión del 10% del genoma. Entre los genes regulados se encuentran operones involucrados en la biosíntesis, transporte y degradación de aminoácidos, ORFs implicados en la producción de diversos tipos de fimbrias, así como proteínas de membrana externa (Calvo y Mathews, 1994). En *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, LRP regula la expresión de elementos involucrados en virulencia, incluyendo al operón *spvABCD*, el cual es determinante para el establecimiento de la infección sistémica (Marshall *et al.*, 1999). LRP reprime directamente la expresión de SsrA, InvF y HilA, por lo tanto, cepas de *S. enterica* Typhimurium deficientes en *Irp* son hipervirulentas y presentan mayor capacidad de invasión (Baek *et al.*, 2009). Análisis *in silico* realizados por Brinkman y colaboradores (2003) muestran al menos un homólogo de LRP presente en el 45% de genomas bacterianos y en el 94% de genomas de arqueas, sugiriendo un ancestro común y una amplia distribución en procariontes para los reguladores tipo LRP.

3.3.2 H-NS

Como se mencionó anteriormente, en bacterias Gram-negativas la familia de proteínas asociadas al nucleóide está compuesta por 12 miembros, uno de los más estudiados y mejor caracterizados es H-NS. Este regulador participa en la organización del cromosoma, cepas de *Escherichia coli* sobreexpresando H-NS presentan compactación anormal del nucleóide (Spurio *et al.*, 1992). Los niveles de expresión de esta proteína nucleóide son constantes a lo largo del crecimiento bacteriano (Dersch *et al.*, 1993). H-NS se autorregula negativamente, su expresión se incrementa con la presencia de la proteína de choque frío CspA y se reprime por StpA y Fur (La Teana *et al.*, 1991; Ueguchi *et al.*, 1993; Troxell *et al.*, 2011).

La proteína H-NS está constituida por 137 aminoácidos, el N-terminal (residuos 1-64) está implicado en oligomerización (Figura 2), sustituciones en el aminoácido Leu30 validan esta aseveración (Ueguchi *et al.*, 1997). El extremo amino se encuentra unido al C-terminal mediante un enlazador, al cual se le ha atribuido un papel en oligomerización: la ausencia de los residuos 46-90 impide la formación de oligómeros pero no de dímeros (Bloch *et al.*, 2003). Por otra parte, mutaciones en los aminoácidos 92, 111, 113, 114, 115 y 116 localizados en el extremo carboxilo demuestran la participación de dicha región en la interacción con el DNA (Ueguchi *et al.*, 1996; Dorman, 2004). De manera interesante, las argininas 12 y 15 están involucradas en el reconocimiento de curvatura en el DNA por H-NS, mutaciones realizadas en estos aminoácidos disminuyen la capacidad de la proteína de interactuar con el DNA (Spurio *et al.*, 1995).



Figura 2. Representación esquemática de los dominios que integran la proteína H-NS. En la parte superior se muestra la secuencia de aminoácidos (Tomada de Tendeng y Bertin, 2003).

H-NS interactúa con las regiones promotoras de un gran número de genes, reconociendo sitios con alto contenido A + T (Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006; Oshima *et al.*, 2006). En un estudio reciente se identificó la secuencia nucleotídica 5'-TCGATATATT-3' como sitio de mayor afinidad para la unión de H-NS (Lang *et al.*, 2007). Sin embargo, también se propone la presencia de curvatura en el DNA como factor de reconocimiento por parte de esta proteína asociada al nucleóide (Jauregui *et al.*, 2003).

El mecanismo de inhibición de la transcripción mediada por H-NS consiste en la unión de la proteína a un sitio primario en el DNA, posteriormente, las moléculas protéicas se extienden sobre los promotores blanco formando filamentos y puentes DNA/H-NS/DNA, evitando la unión de la RNA polimerasa al promotor (Rimsky *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2007). H-NS también es capaz de

reprimir la expresión transcripcional al unirse corriente arriba y corriente abajo del promotor, la interacción de los dímeros de H-NS dobla el DNA, formando un complejo nucleorrepresor, el cual atrapa a la RNA polimerasa o impide su acceso al promotor (Dame *et al.*, 2002).

H-NS es capaz de inhibir la transcripción de más de 1000 genes del cromosoma de *E. coli* (Oshima *et al.*, 2006), algunos codifican componentes de la envoltura celular (*gmd*, *wzc*, *rfal*, *wbbJ*, *ompX*) y proteínas involucradas en la adaptación a cambios ambientales (*dps*, *phoP*, *rpoS*) (Hommais *et al.*, 2001). En *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, H-NS reprime la expresión de genes codificados en las islas de patogenicidad 1 – 5 y del locus *spv*, no obstante, cepas mutantes en *hns* se encuentran atenuadas en el modelo de infección en ratón, debido a que la delección de este gen genera mutaciones adicionales en *rpoS* y *phoP*, disminuyendo el crecimiento de la bacteria (Harrison *et al.*, 1994; Navarre *et al.*, 2006). Esta proteína asociada al nucleóide también reprime la expresión de factores transcripcionales involucrados en virulencia tales como HilA, SpvR, LeuO (O'byrne y Dorman, 1994; Navarre *et al.*, 2006). Es relevante mencionar que la mayoría de los genes reprimidos por H-NS han sido adquiridos por transferencia horizontal, razón por lo cual se le denomina el centinela del genoma (Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006; Oshima *et al.*, 2006; Dorman, 2007).

3.4 Reguladores tipo LysR involucrados en virulencia

Además de las proteínas asociadas al nucleóide, algunos reguladores transcripcionales tipo LysR (LTTR) controlan la expresión transcripcional de genes implicados en la virulencia de *Salmonella*. Los reguladores LysR actúan como activadores o represores transcripcionales y la mayoría de ellos se autorregulan, a excepción de MleR y AlsR (Henikoff *et al.*, 1988; Schell, 1993).

Los LTTR están compuestos por 300 – 350 aminoácidos. El efecto de sustituir los aminoácidos 227, 253 de NahR; 196 y 205 de NodD; y el aminoácido

199 de OxyR, demuestra la participación del C-terminal en el reconocimiento a una molécula inductora (Figura 3; Schell *et al.*, 1990; Burn *et al.*, 1989; Storz *et al.*, 1990). El C-terminal se encuentra unido al N-terminal mediante un enlazador implicado en oligomerización (Schell *et al.*, 1993). El extremo amino presenta un dominio de unión al DNA Hélice-Vuelta-Hélice (HTH) altamente conservado (aminoácidos 1-65). Sustituciones de los residuos Ala27 en NahR y de Ser38 en CysB restringen la capacidad del LTTR de unirse al DNA (Schell *et al.*, 1990; Colyer y Kredich, 1991).

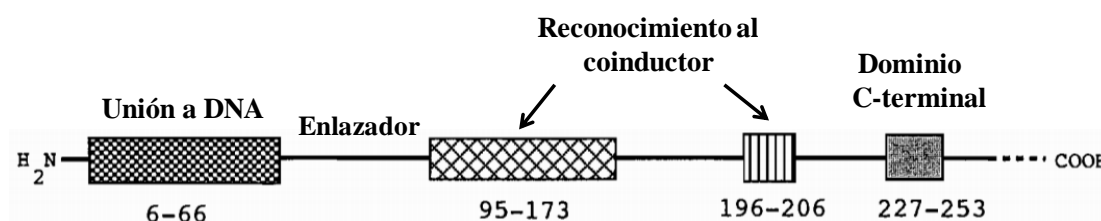


Figura 3. Representación esquemática de la organización estructural de los reguladores tipo LysR (Tomada de Schell, 1993).

Los LTTR regulan positiva o negativamente una gran cantidad de genes involucrados en diversas funciones como virulencia, metabolismo, quórum sensing, fijación de nitrógeno, respuesta a estrés oxidativo y movilidad (Schlaman *et al.*, 1992; Kovacicova y Skorupski, 1999; Cao *et al.*, 2001; Deghmane *et al.*, 2002; Russell *et al.*, 2004; Maddocks y Oyston, 2008). Diversos estudios han propuesto que para promover activación transcripcional, algunos LTTR forman dímeros, los cuales se unen a las regiones RBS (Regulatory binding site) y ABS (Activation binding site; Figura 4a). La interacción entre los dímeros, promueve la formación de un tetrámero, provocando curvatura en el DNA (Figura 4b). Posteriormente la RNA polimerasa se une al promotor y, en presencia de un coinductor, el regulador es capaz de interactuar con la RNA polimerasa promoviendo la transcripción (Figura 4c y 4d) (Akura y Winans, 2002; Maddocks y Oyston, 2008). En algunos casos no se requiere el coinductor para activar la transcripción.

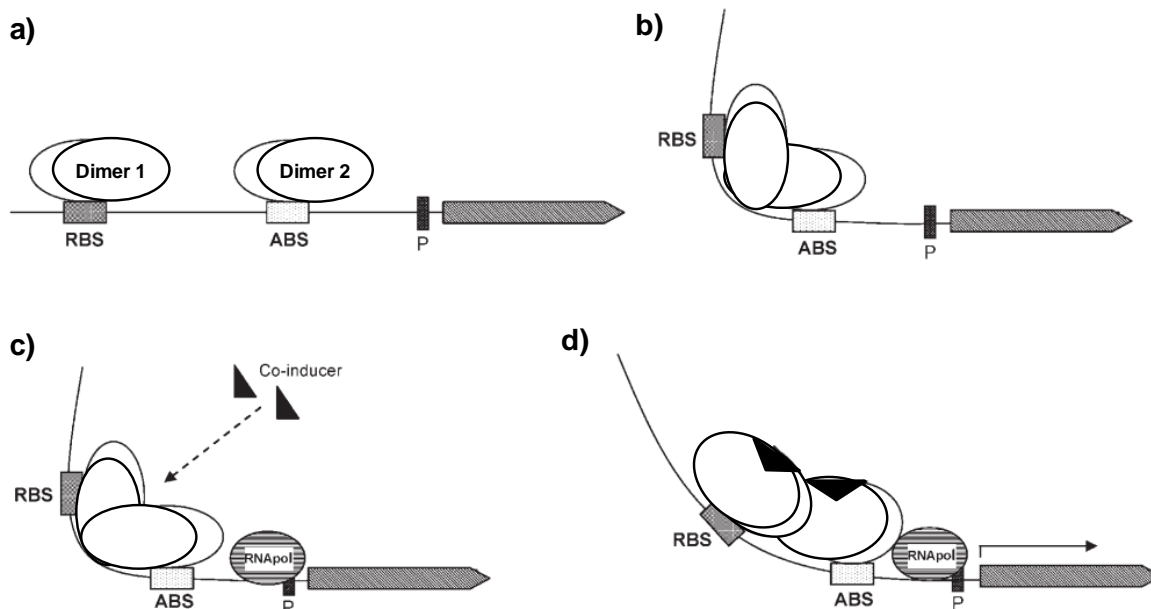


Figura 4. Representación esquemática del mecanismo de activación mediado por LTRR (Tomada de Maddocks y Oyston, 2008).

Para la regulación negativa mediada por los reguladores tipo LysR, no está definido un mecanismo común; en algunos casos, el regulador se une sobre la caja -35 impidiendo la entrada de la RNA polimerasa (Kim *et al.*, 2003).

Los reguladores tipo LysR representan el tipo más abundante de factores transcripcionales dentro del reino procariota. Se han identificado 3864 miembros en α , β , γ , δ proteobacterias, organismos Gram-positivos, arqueas y eucariontes (Pérez-Rueda, 2001; Sun y Klein, 2004). En *Salmonella* se han identificado 44 miembros de ésta familia (www.Era7.com/ExtraTrain/), dentro de los cuales, al menos, SpvR, Hrg, STM1625, OxyR, CysB, MetR y LeuO son relevantes en la interacción *Salmonella*–célula eucariótica (Lahiri *et al.*, 2009).

SpvR induce su propia expresión y la del operón *spvABCD* en fase estacionaria, SpvR también es relevante en el proceso de infección. Cepas de *S. enterica* Typhimurium $\Delta spvR$ muestran menor supervivencia en el intestino, utilizando el modelo de *Caenorhabditis elegans* (Alegado y Tan, 2008).

Se ha propuesto la activación de OxyR en respuesta a adrenalina, manteniendo al patógeno preparado para enfrentar el estrés ocasionado por la presencia de peróxido en el intestino del hospedero (Karavolos *et al.*, 2008). Por otra parte, experimentos en macrófagos RAW264.7 realizados por Lahiri y colaboradores (2008), demostraron una menor capacidad de sobrevivir y replicarse por parte de una cepa *S. enterica* Typhimurium mutante en el gen *hrg*, comparada con la cepa silvestre. STM1625 se expresa cuando *Salmonella* se encuentra dentro del macrófago, sugiriendo un papel en la virulencia (Eriksson *et al.*, 2003).

Dentro del hospedero, bajo condiciones limitadas de nutrientes, la regulación de la biosíntesis de aminoácidos es una estrategia utilizada por *Salmonella* para asegurar su sobrevivencia. Reguladores LysR implicados en este proceso son CysB (regulador de la producción de cisteína), MetR (activador de enzimas para la síntesis de metionina) y LeuO (regulador de genes implicados en la biosíntesis de leucina; Lahiri *et al.*, 2009).

3.4.1 *LeuO*

LeuO es un regulador transcripcional perteneciente a la familia LysR. En *Enterobacteriaceae*, incluyendo *Salmonella*, *leuO* se encuentra ubicado entre los operones *ilvIH* y *leuABCD*, involucrados en la biosíntesis de isoleucina-valina y leucina, respectivamente (Henikoff *et al.*, 1988).

La expresión de LeuO ha sido detectada en fase estacionaria (VanBogelen *et al.*, 1996) y en medio carente de leucina, isoleucina y valina (Majumder *et al.*, 2001). Esta actividad es dependiente de los niveles de guanosina 3,5-bipirofosfato (ppGpp), pero independiente del factor de estrés sigma S (Fang *et al.*, 2000). A pesar de lo anterior, no se conoce el inductor necesario para la activación de LeuO y las condiciones de expresión tanto en vida libre como en el hospedante no se encuentran bien definidas.

En *E. coli*, LeuO fue identificado originalmente como regulador positivo del operón *leuABCD*. Actualmente, también se conoce su papel en la activación del operón *bglGFB*, implicado en la utilización de β -D-glucósidos (Ueguchi, *et al.*, 1998). Adicionalmente, LeuO regula positivamente a *yjjQ-bglJ* y a *rovA*, los cuales codifican para un factor de transcripción de la familia LuxR (Stratmann *et al.*, 2008) y un regulador del tipo MarA/SlyA (Lawrenz y Miller, 2007), respectivamente. Por otra parte, LeuO es un represor de *cadC* y *dsrA*, el primero codifica para un activador del operón *cadAB* (involucrado en la descarboxilación de lisina), y el segundo para un RNA regulador del factor sigma de estrés (Shi y Bennett, 1995; Klauck *et al.*, 1997).

Algunos de los genes dependientes de LeuO se encuentran regulados negativamente por el regulador global H-NS (Ueguchi *et al.*, 1998; De la Cruz *et al.*, 2007; Hernández-Lucas *et al.*, 2008).

Diferentes experimentos *in vivo* han demostrado el papel de LeuO en la virulencia de *Salmonella* (Tenor *et al.*, 2004; Lawley *et al.*, 2006) y en la formación de biopelículas en *Vibrio cholerae* (Moorthy y Warnick, 2005).

3.4.1.1 El regulón LeuO en *Salmonella*

En *Salmonella*, LeuO parece estar involucrado en el control de la patogénesis, principalmente en los primeros estadios de la invasión; cepas mutantes en este regulador muestran atenuación en el modelo murino (Lawley *et al.*, 2006).

LeuO activa la expresión de las proteínas de membrana externa OmpS1 (De la Cruz *et al.*, 2007) y OmpS2 (Fernández-Mora *et al.*, 2004) en *Salmonella enterica* serovar Typhi. OmpS1 está involucrada en la movilidad tipo “swarming” y la formación de biopelículas (Toguchi *et al.*, 2000; Mireles *et al.*, 2001). *ompS2* codifica para una proteína de 362 aminoácidos (Fernández-Mora *et al.*, 2004).

Con el fin de ampliar el repertorio de los genes pertenecientes al regulón LeuO, se realizaron estudios proteómicos y transcripcionales. Los resultados demostraron que la sobreexpresión de dicho regulador en *Salmonella enterica* serovar Typhi IMSS-1 afecta la expresión de 13 proteínas, 10 de manera positiva y 3 de manera negativa (Hernández-Lucas *et al.*, 2008). Las proteínas reguladas de forma negativa por LeuO corresponden a OmpX, Tpx y STY1978. Por otra parte, se identificaron a las porinas OmpS2, OmpS1 (presente en cinco isoformas), Asst (identificada en dos isoformas) y la proteína STY3068 (CasC) como los elementos regulados positivamente por LeuO. OmpX es una proteína de membrana externa involucrada en el transporte de compuestos hidrofóbicos a través de la membrana. La inactivación del gen *ompX* produce un incremento de la tolerancia a dodecil sulfato de sodio y a diferentes antibióticos (Otto y Hermansson, 2004). El gen *tpx* codifica para una enzima periplásmica antioxidante cuya expresión se activa en diferentes condiciones de pH, durante la fase exponencial y en la formación de biopelículas (Stancik *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006). Para STY1978 no ha sido asignada alguna función. Asst corresponde a una arilsulfato sulfotransferasa implicada en procesos de detoxificación, cataliza la transferencia de un grupo sulfato éster fenilsulfato a aceptores fenólicos (Kwon *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2001). STY3068 o CasC es el tercer componente de un posible operón constituido por siete ORF's: STY3070, STY3069, STY3068, STY3067, STY3066, STY3065, STY3064, ortólogos de estos genes en *E. coli* K-12 se denominan *casA*, *casB*, *casC*, *casD*, *casE*, *cas1* y *cas2*, los cuales codifican para proteínas Cas.

3.5 El sistema inmune CRISPR/Cas

Las proteínas Cas junto con las secuencias CRISPR forman un sistema de defensa en procariontes contra la invasión de fagos y plásmidos (Barrangou *et al.*, 2007; Brouns *et al.*, 2008; Marraffini y Sontheimer, 2008).

Los fagos son los principales depredadores bacterianos. Debido a esto, las bacterias poseen diversos mecanismos para sobrevivir el ataque viral. Dentro de

las estrategias bacterianas desarrolladas se encuentran la interrupción de la absorción del fago y de la inyección de su material genético, los sistemas de restricción/modificación y la inducción de infecciones abortivas (Labrie *et al.*, 2010). Estudios recientes han identificado un novedoso sistema involucrado en la defensa contra el ataque de material genético extraño denominado CRISPR/Cas. Este sistema se encuentra presente en el 40% de los genomas de bacterias y en el 90% de genomas de arqueas (Kunin *et al.*, 2007). El sistema funciona de la siguiente manera: las poblaciones bacterianas al ser infectadas por bacteriófagos generalmente son erradicadas en un 99%. Sin embargo, una pequeña parte de la población sobrevive y adquiere resistencia al elemento invasor. La inmunidad se obtiene al incorporar una pequeña porción del DNA viral dentro de las secuencias CRISPR. Posteriormente, esta secuencia de DNA se expresa conjuntamente con el sistema CRISPR/Cas, generando RNAs pequeños, los cuales son capaces de alinearse con el material genético viral derivado de reinfecciones. Las proteínas Cas reconocen estos complejos y degradan el genoma invasor, proporcionando inmunidad bacteriana (Sorek *et al.*, 2008).

El sistema CRISPR/Cas, está integrado por una región reguladora encargada de controlar la transcripción de las proteínas Cas, las cuales poseen dominios de nucleasas, helicasas, integrasas y polimerasas (Haft *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2006). Río abajo de las proteínas Cas se localiza una secuencia líder no codificable rica en adeninas y timinas (Jansen *et al.*, 2002b). Ésta región funciona como sitio de reconocimiento para la inserción de DNA exógeno (Lillestøl *et al.*, 2006). Finalmente, se localiza el cluster CRISPR compuesto por secuencias palindrómicas repetidas (28-40 pb) separadas por secuencias conocidas como espaciadores (26-72 pb; Figura 5; Mojica *et al.*, 2000; Jansen *et al.*, 2002a). Algunos de estos fragmentos poseen homología con elementos extracromosomales como fagos y plásmidos (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005).

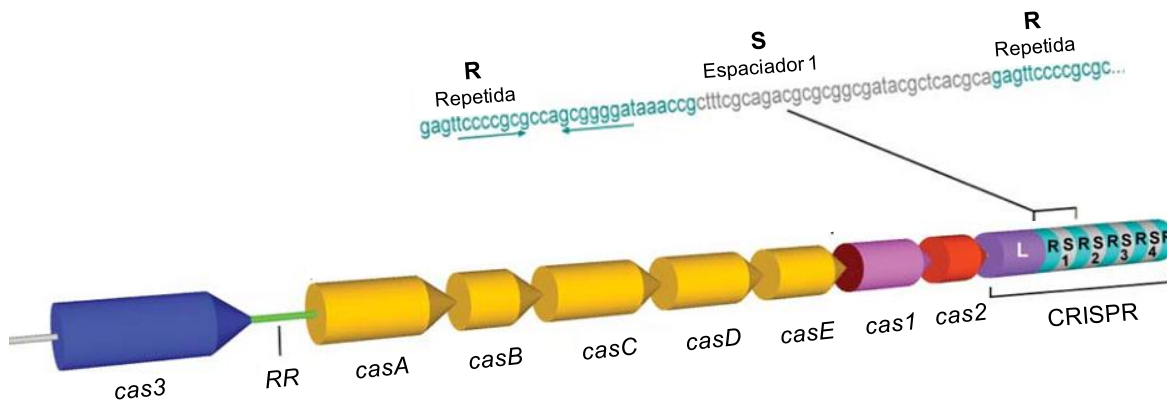


Figura 5. Representación esquemática del sistema CRISPR/Cas de *E. coli* K-12. RR: región reguladora, contiene el promotor para la expresión de los genes *cas*, L: líder, R: regiones repetidas, S: espaciadores (Tomada de Al-Attar *et al.*, 2011).

Estudios realizados en los últimos años han propuesto que el mecanismo de resistencia mediada por CRISPR/Cas se lleva a cabo en tres etapas: Adaptación, Expresión e Interferencia (Al-Attar *et al.*, 2011).

La etapa de adaptación inicia cuando el sistema CRISPR/Cas detecta la entrada de material genético extraño. La proteína Cas1, la cual contiene dominios de nucleasa e integrasa (Makarova *et al.*, 2006; Wiedenheft *et al.*, 2009), se encuentra involucrada en la adquisición e incorporación de DNA exógeno en el extremo 3' del líder, generando un nuevo espaciador (Barrangou *et al.*, 2007). La adición de dicho fragmento implica también la incorporación de una secuencia repetida (Figura 6a; van der Oost *et al.*, 2009). La selección del espaciador a incorporar no es al azar. Se han detectado diferentes motivos (PAM, protospacer adjacent motif) flanqueando los fragmentos que formarán parte de las secuencias CRISPR (Karginov y Hannon, 2010). Además la presencia de los PAMs ayuda al sistema a distinguir entre elementos propios y foráneos, evitando eventos de autoinmunidad (Marraffini y Sontheimer, 2010).

El resultado de la etapa de adaptación es la incorporación de un fragmento del DNA invasor. Posteriormente, la bacteria, al enfrentar nuevos ataques virales, es capaz de transcribir el sistema CRISPR/Cas, iniciando la etapa de expresión.

En *Escherichia coli* K-12, las proteínas Cas se transcriben generando una unidad de CasA, dos unidades de CasB, seis moléculas de CasC, una de CasD y una unidad de CasE, las cuales se agrupan en un complejo multienzimático denominado “Cascada” (CRISPR-associated complex for antiviral defense; Brouns *et al.*, 2008; Jore *et al.*, 2011). Por otra parte, el cluster CRISPR al transcribirse forma un RNA (pre-crRNA). Las secuencias repetidas adquieren una estructura secundaria de tallo y asa (Figura 6B; Kunin *et al.*, 2007), la cual funciona como señal para la unión de Cascada. Posteriormente, el pre-crRNA es procesado por la endonucleasa CasE en pequeños RNAs denominados crRNAs (CRISPR-RNA) (Brouns *et al.*, 2008). Mutaciones realizadas en los genes *casA*, *casB* y *casC* no afectan la generación de los RNAs pequeños, sin embargo, mutantes en los genes sobrelapados *casD* y *casE* son incapaces de producir los crRNAs (Brouns *et al.*, 2008). Cada crRNA está formado por 8 nucleótidos de la secuencia repetida 5', un espaciador de 32 pb y un número variable de nucleótidos de la repetida 3' (Marraffini y Sontheimer, 2010).

Finalmente, en la fase de interferencia, el complejo Cascada permanece unido a los crRNAs, los cuales guían a las proteínas Cas hacia el material genético invasor. Los pequeños RNAs con homología al ácido nucleico extraño hibridan con la cadena complementaria (Figura 5c), desplazando a la cadena no complementaria (Jore *et al.*, 2011). Ésta última es degradada por la proteína Cas3, debido a su actividad de ssDNA nucleasa (Sinkunas *et al.*, 2011). El dominio de helicasa de Cas3 le permite remodelar el complejo DNA invasor-crRNA/Cascada, desplazando a crRNA/Cascada. Este evento genera una nueva cadena sencilla de DNA, la cual puede ser procesada por el dominio de nucleasa de Cas3 (Sinkunas *et al.*, 2011). De este modo, el material genético viral es erradicado y la bacteria sobrevive a la infección (Figura 6C). Aunque no se ha definido el papel de Cascada en la fase de interferencia, en *E. coli* K12 es necesaria la sobreexpresión de Cascada y Cas3 para observar el fenotipo de resistencia a fagos (Brouns *et al.*, 2008).

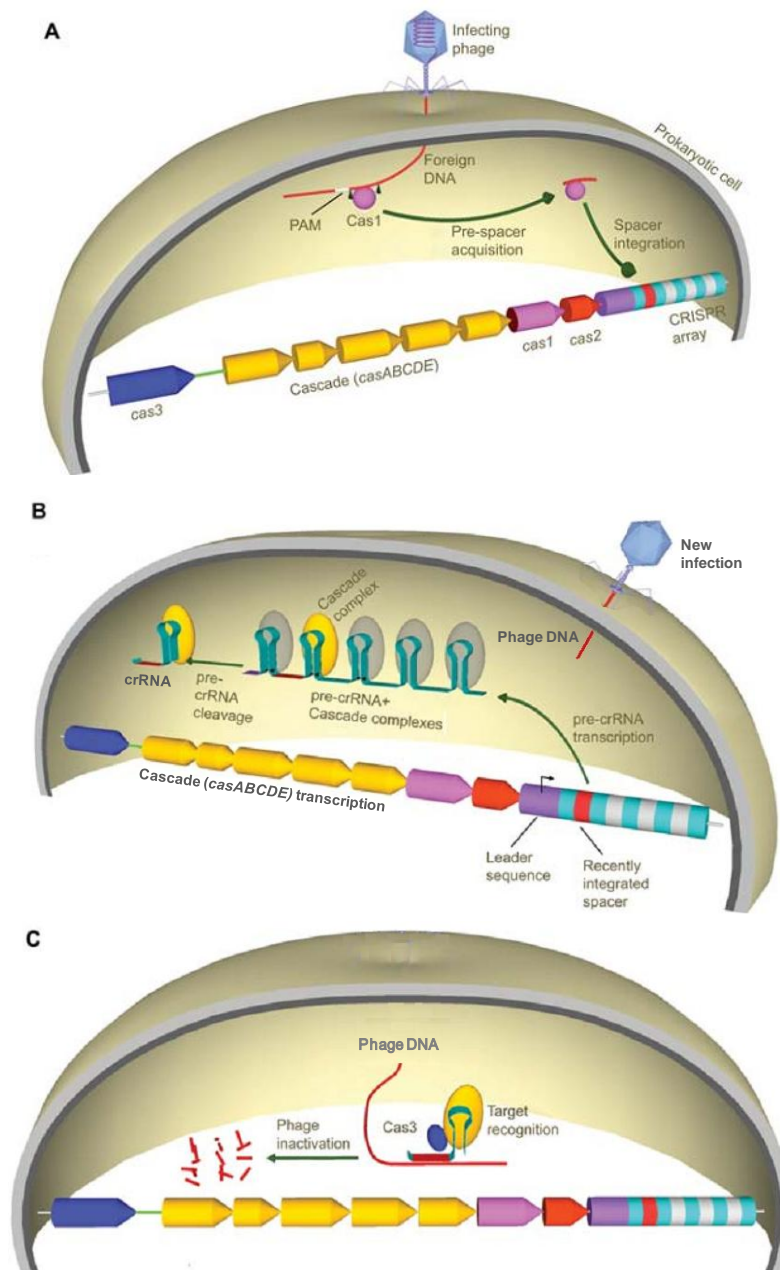


Figura 6. Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas. A) Etapa de adaptación: la maquinaria CRISPR/Cas detecta la entrada de DNA foráneo, Cas1 obtiene un fragmento de dicho DNA, el cual es incorporado en el cluster CRISPR como un nuevo espaciador. B) Etapa de expresión: el procarionte es infectado nuevamente, las proteínas Cas y el locus CRISPR se transcriben, las secuencias CRISPR forman estructuras de tallo y asa a las cuales se une el complejo de Cascada (CasABCDE), CasE escinde el transcrito en pequeños RNAs (crRNAs). C) Etapa de interferencia: los crRNAs permanecen unidos a la Cascada para guiar el complejo hacia el DNA invasor, el crRNA se une a su región complementaria en el material genético extraño y este último es degradado por Cas3. De este modo, la bacteria resiste el ataque viral (Tomada de Al-Attar *et al.*, 2011).

La función de algunas proteínas Cas ha sido demostrada en *Escherichia coli* K12, como se describió anteriormente. Sin embargo, existen un total de 45 familias de proteínas Cas, distribuidas en más de 310 genomas de bacterias y arqueas (Makarova *et al.*, 2011), de las cuales, en su mayoría se desconoce su papel en el mecanismo de defensa contra DNA exógeno (Haft *et al.*, 2005). Algunas de estas proteínas, como Cas1 y Cas2 están presentes en todos los arreglos CRISPR/Cas determinados (Jansen *et al.*, 2002b), por lo tanto, se consideran marcadores genéticos de este locus. La mayoría de los 45 genes *cas* se asocian específicamente entre ellos, constituyendo ocho diferentes organizaciones o subtipos Cas (Figura 7). Algunas proteínas Cas varían en su contexto genómico y no se han podido agrupar dentro de un subtipo específico. Éstas se conocen como módulo *cmr* o RAMP (Repeat-associated mysterious proteins; Haft *et al.*, 2005).

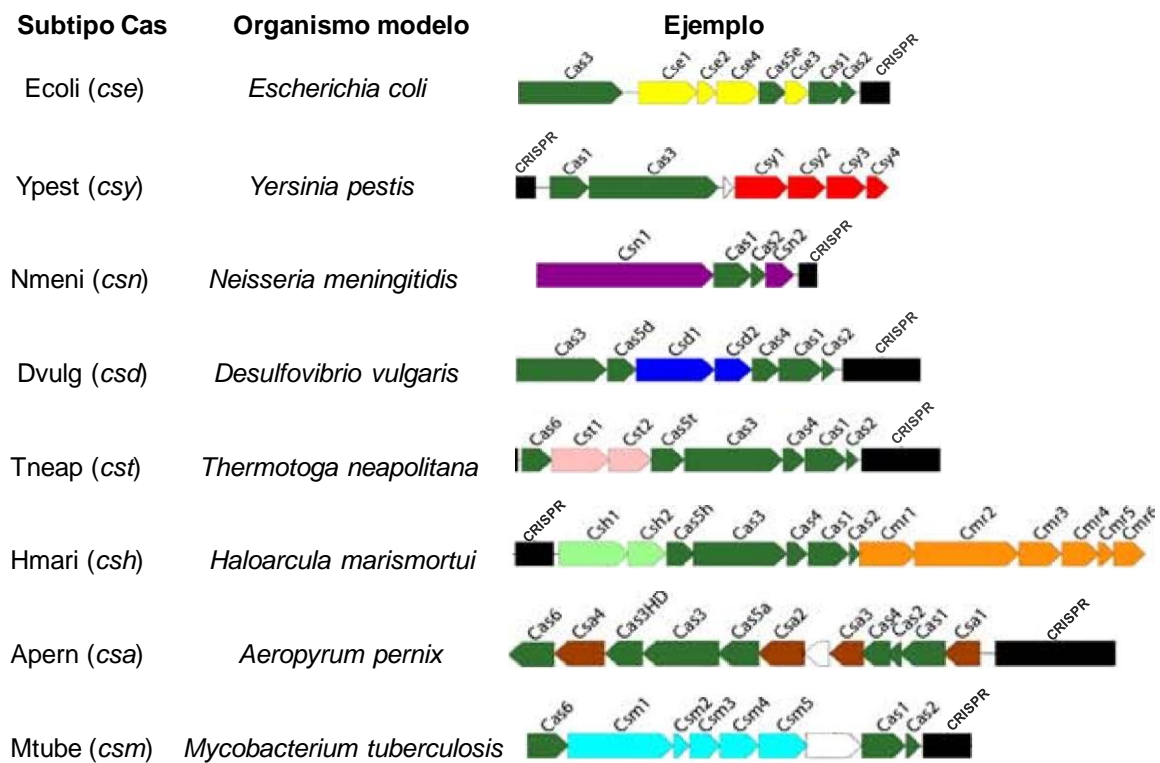


Figura 7. Subtipos de proteínas Cas. Cada subtipo recibe el nombre de acuerdo al microorganismo donde se describió por primera vez el arreglo (Tomada de Haft *et al.*, 2005).

La combinación de las diferentes proteínas Cas origina una amplia diversidad de sistemas CRISPR/Cas, la cual se incrementa debido a que cada locus CRISPR contiene un número variable de secuencias repetidas y espaciadores. Adicionalmente existen 12 tipos de secuencias repetidas, de acuerdo al orden de nucleótidos y a su estructura secundaria. Generalmente, un conjunto de proteínas Cas se asocia preferentemente a un(os) tipo(s) específico(s) de secuencias repetidas (Kunin *et al.*, 2007). Por ejemplo, el subtipo Cas cse (presente en *E. coli*; Figura 5) se encuentra asociado al tipo 1 de secuencias repetidas (5'-GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCG-3'). Esta gran diversidad de locus CRISPR/Cas, sugiere la existencia de variaciones en el mecanismo de acción de este sistema inmune (Terns y Terns, 2011). Por ejemplo, en *Pyrococcus furiosus*, *Streptococcus pyogenes* y *E. coli* K-12 se requieren una (Cas6), dos (RNasa III, Csn1) y cinco proteínas (complejo Cascada), respectivamente, para la producción de los RNAs pequeños (Brouns *et al.*, 2008; Carte *et al.*, 2008; Deltcheva *et al.*, 2011).

Se han realizado múltiples investigaciones para entender el mecanismo de defensa CRISPR/Cas. No obstante, existe un número limitado de reportes sobre la etapa de expresión y regulación de la transcripción de este sistema inmune en procariontes.

4. ANTECEDENTES

4.1 Regulación transcripcional del sistema CRISPR/Cas de *Salmonella enterica* serovar Typhi IMSS-1

Salmonella enterica serovar Typhi IMSS-1 contiene un conjunto CRISPR/Cas constituido por una región reguladora 5' de 356 pb; ocho genes *cas* (STY3071, STY3070-STY3069-STY3068-STY3067-STY3066-STY3065-STY3064) ortólogos de *cas3*, *casA-casB-casC-casD-casE-cas1-cas2* presentes en *Escherichia coli* K12 (Brouns *et al.*, 2008); además de una secuencia líder (84 pb); siete secuencias repetidas de 29 pb y seis espaciadores de 32 pb (Figura 8).

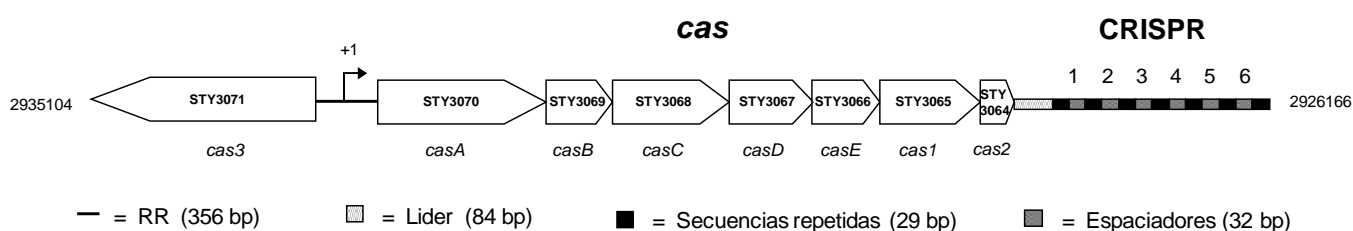
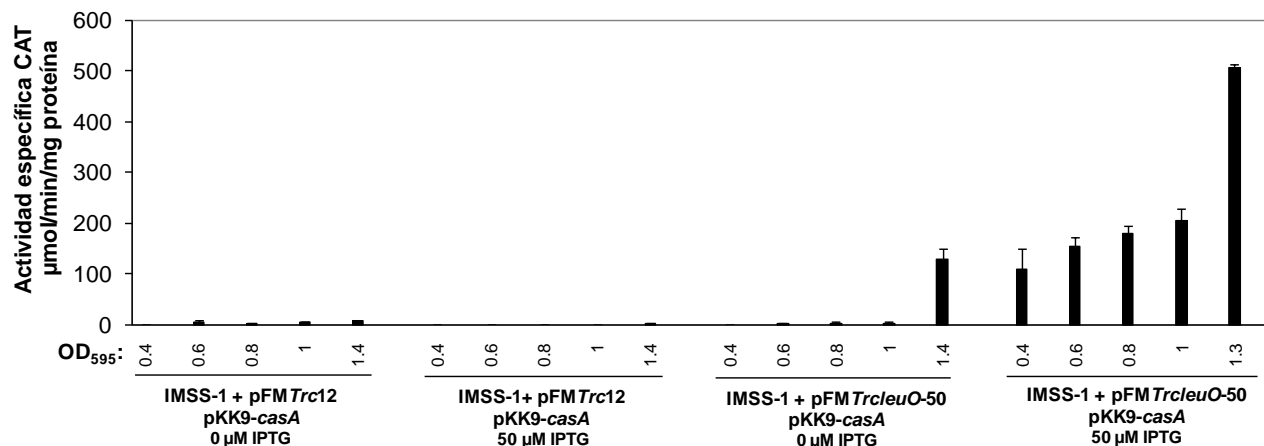


Figura 8. Representación esquemática del sistema CRISPR/Cas en *Salmonella enterica* serovar Typhi IMSS-1.

En *S. enterica* Typhi no existen reportes que definan el papel del cluster CRISPR/Cas. Se ha demostrado que *casC* (STY3068) se expresa cuando *Salmonella enterica* serovar Typhi se encuentra en macrófagos de humanos, sugiriendo un posible papel en virulencia (Faucher *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, la proteína LeuO regula positivamente cuatro genes del cromosoma de *S. enterica* Typhi: *ompS1*, *ompS2*, *asst* y *casC* (Hernández-Lucas *et al.*, 2008). Sin embargo, fusiones transcripcionales al reportero *cat* de la región intergénica 5' de *casC* no mostraron actividad transcripcional en presencia de LeuO, indicando la ausencia del promotor dependiente de este regulador en la zona evaluada. Debido a lo anterior, se realizaron fusiones transcripcionales con la región promotora del primer gen del arreglo: *casA*. Los resultados revelaron que este ORF también es regulado positivamente por LeuO, sugiriendo una posible organización en operón de los genes *casA-casB-casC* (Gráfica 1; Hernández-Lucas *et al.*, 2008).



Gráfica 1. Ensayo de actividad específica de CAT de la región promotora de *casA* en presencia (pFMTrcleuO-50) y ausencia de LeuO (pFMTrc12). Los ensayos se realizaron en medio rico MA a OD₅₉₅ de 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y a las 12 h de crecimiento (Tomada de Hernández-Lucas *et al.*, 2008).

casA presenta una región intergénica 5' de 356 pb, la cual contiene los elementos necesarios para su activación mediada por LeuO. Experimentos de "primer extension" revelaron dos inicios de transcripción dependientes de LeuO en la región 5' de *casA* (Figura 9A) ubicados en las bases -84 y -94 respecto al inicio de la traducción. Por otra parte, ensayos de protección a la enzima DNasa demuestran la unión de LeuO a dos zonas de la región reguladora de *casA* (Figura 9B). Estos sitios se localizan de la base -140 a la -188 y de -193 a -223, respecto al inicio de traducción (Figura 9C; Hernández-Lucas *et al.*, 2008).

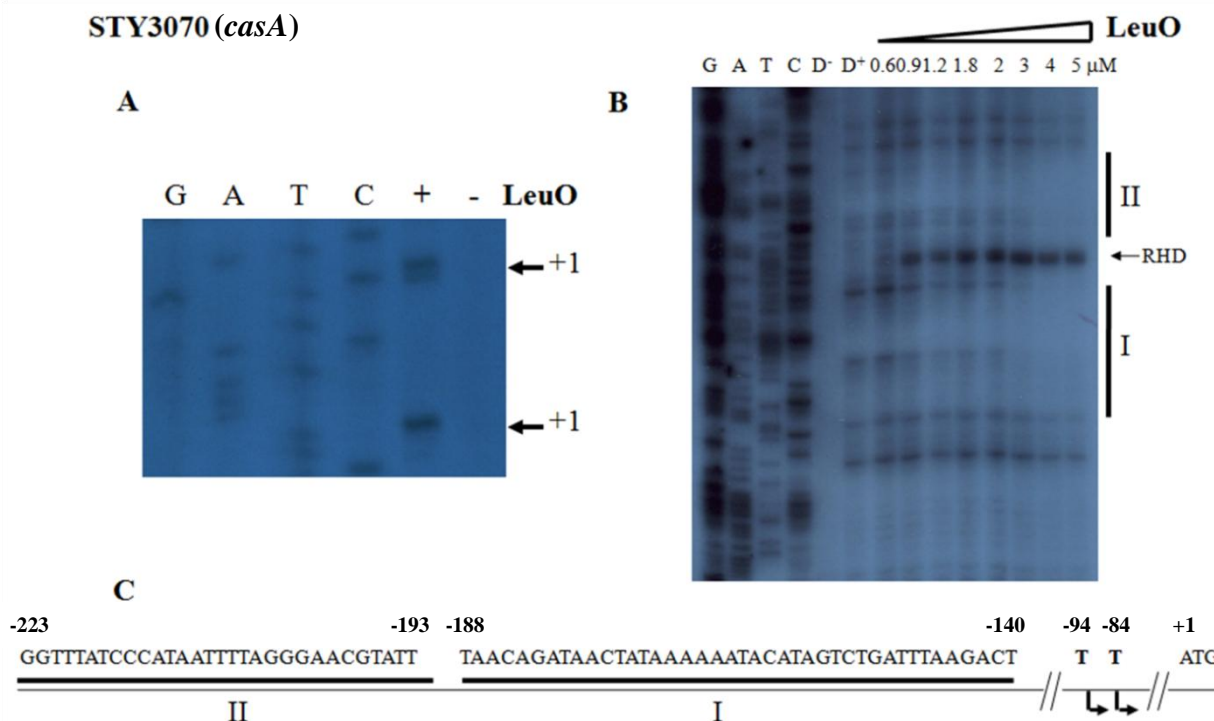


Figura 9. Inicios de la transcripción y sitios de unión para LeuO en la región reguladora de *casA*. **A)** Primer extension donde se observan los inicios de la transcripción del gen *casA* dependientes de LeuO. **B)** Ensayo de protección a la enzima DNasa I, las líneas verticales muestran los sitios de unión a LeuO, en la parte superior se observan las concentraciones utilizadas de proteína. RHD: Regiones de hipersensibilidad a la DNasa. **C)** Localización del inicio de la traducción, de la transcripción y los sitios de unión a LeuO de la región intergénica 5' de *casA*. Las flechas indican los inicios de transcripción para *casA* detectados por primer extension, I y II corresponde a los sitios de LeuO determinados en los ensayos de footprinting, los números corresponden a las coordenadas respecto al inicio de la traducción (Tomada de Hernández-Lucas *et al.*, 2008).

LeuO es capaz de antagonizar el efecto represor de la proteína asociada al nucleoide H-NS (Chen *et al.*, 2003; De la Cruz *et al.*, 2007), por esta razón se evaluó la expresión de *casA* en una cepa de *S. enterica* Typhi deficiente en *hns*, encontrando la regulación negativa ejercida este regulador global sobre el promotor *casA* (Hernández-Lucas *et al.*, 2008).

De manera interesante, los datos obtenidos en nuestro grupo de trabajo sobre la regulación de CRISPR/Cas por LeuO y H-NS en *Salmonella enterica* serovar Typhi también han sido observados en *Escherichia coli* K12. Utilizando

ensayos de Northern blot, Shimada y colaboradores (2009) determinaron una sola unidad transcripcional para los genes *casABCDE12*, cuya presencia fue detectada al sobreexpresar LeuO y en una cepa de *E. coli* Δ *hns*. Por lo tanto, los genes *cas* son regulados positivamente por LeuO y reprimidos por H-NS. Experimentos de “primer extension” en *E. coli*, revelan la presencia de un promotor en la región intergénica 5’ de *casA* y en el líder de las secuencias CRISPR. Ambos son reprimidos de manera directa por H-NS (Pul *et al.*, 2010). Sin embargo, LeuO es capaz de desplazar a la proteína asociada al nucleóide de la región reguladora de *casA*, permitiendo su activación transcripcional (Westra *et al.*, 2010).

Además del papel de H-NS y LeuO en la regulación transcripcional del sistema CRISPR/Cas en enterobacterias, no se ha determinado la participación de otros elementos reguladores. Con el objetivo de conocer otras proteínas reguladoras involucradas en el control transcripcional de *casA* en *Salmonella enterica* serovar Typhi, se realizaron estudios *in silico*. Los resultados sugieren la participación de IHF, Lrp y NarP en la regulación transcripcional del sistema CRISPR/Cas (Figura 9).

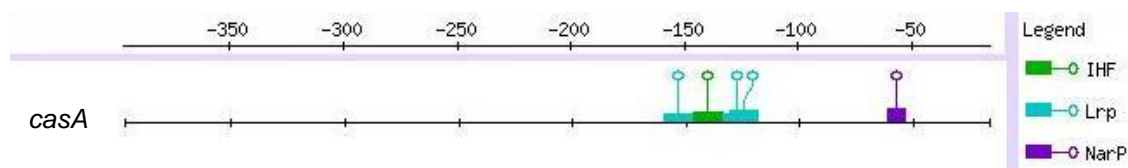


Figura 9. Sitios de unión determinados *in silico* para diferentes reguladores transcripcionales en la región 5’ de *casA*.

La organización transcripcional del sistema CRISPR/Cas, la posible participación de otras proteínas reguladoras, diferentes a H-NS y LeuO, implicadas en el control de éste conjunto genético y la funcionalidad en la resistencia a fagos, son aspectos no determinados hasta el momento en *Salmonella enterica* serovar Typhi.

5. JUSTIFICACIÓN

En los últimos cuatro años se ha realizado un avance sustancial en la descripción del mecanismo de acción y la bioquímica del sistema de defensa contra la invasión de DNA/RNA foráneo CRISPR/Cas. Sin embargo, no se han determinado las condiciones necesarias para la expresión, ni los mecanismos de regulación transcripcional involucrados en el funcionamiento de este sistema inmune en enterobacterias. Es relevante realizar estudios para determinar las condiciones naturales, así como los elementos genéticos involucrados en el control de la expresión de este novedoso sistema en bacterias patógenas. Ésta información nos ayudará a dilucidar la función e impacto del sistema CRISPR/Cas en el ciclo de vida de estos microorganismos.

6. HIPÓTESIS

Múltiples señales y diferentes proteínas reguladoras globales se encuentran involucradas en el control transcripcional del cluster CRISPR/Cas en *Salmonella enterica* serovar Typhi.

7. OBJETIVO GENERAL

Establecer el mecanismo molecular ejercido por LeuO, LRP y H-NS, en la regulación transcripcional del sistema CRISPR/Cas en *Salmonella enterica* serovar Typhi.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer si los genes *casABCDE12* y las secuencias CRISPR constituyen un operón dependiente de LeuO en *Salmonella enterica* serovar Typhi.
- Identificar los nucleótidos relevantes para la actividad mediada por LeuO en la región promotora de *casA*.
- Caracterizar la(s) zonas(s) de regulación negativa mediada por H-NS en la región 5' de *casA*.
- Definir el papel de LRP en la regulación transcripcional de CRISPR/Cas.
- Establecer si H-NS y Lrp regulan de manera directa o indirecta a *casA*.
- Determinar la expresión del cluster CRISPR/Cas, presente en *S. enterica* Typhi, en diferentes condiciones de crecimiento.

9. RESULTADOS

En este proyecto de investigación se determinó mediante fusiones transcripcionales, RT-PCR y Northern blot, que los genes *cas* y las secuencias CRISPR constituyen una unidad transcripcional dependiente del regulador LeuO. Se identificaron dos zonas de regulación negativa presentes en la región reguladora de *casA*. Las proteínas asociadas al nucleoide H-NS y LRP interaccionan con éstas zonas reprimiendo el cluster genético CRISPR/Cas. De manera interesante, se detectó expresión del sistema CRISPR/Cas cuando *S. enterica* Typhi fue cultivada en medio mínimo N.

Los resultados mencionados anteriormente constituyen la base de un artículo publicado en la revista *Journal of Bacteriology*.

The CRISPR/Cas Immune System Is an Operon Regulated by LeuO, H-NS, and Leucine-Responsive Regulatory Protein in *Salmonella enterica* Serovar Typhi^{∇†}

L. Medina-Aparicio, J. E. Rebollar-Flores, A. L. Gallego-Hernández, A. Vázquez, L. Olvera, R. M. Gutiérrez-Ríos, E. Calva, and I. Hernández-Lucas*

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

Received 8 December 2010/Accepted 4 March 2011

Prokaryotes have developed multiple strategies to survive phage attack and invasive DNA. Recently, a novel genetic program denominated the CRISPR/Cas system was demonstrated to have a role in these biological processes providing genetic immunity. This defense mechanism is widespread in the *Archaea* and *Bacteria*, suggesting an ancient origin. In the last few years, progress has been made regarding the functionality of the CRISPR/Cas system; however, many basic aspects of the system remain unknown. For instance, there are few studies about the conditions and regulators involved in its transcriptional control. In this work, we analyzed the transcriptional organization of the CRISPR/Cas system as well as the positive and negative regulators involved in its genetic expression in *Salmonella enterica* serovar Typhi. The results obtained show that in *S. Typhi* the CRISPR/Cas system is a LeuO-dependent operon silenced by the global regulator LRP, in addition to the previously known nucleoid-associated protein H-NS; both LRP and H-NS bind upstream and downstream of the transcriptional start site of *casA*. In this study, relevant nucleotides of the *casA* regulatory region that mediate its LeuO transcriptional activation were identified. Interestingly, specific growth conditions (N-minimal medium) were found for the LeuO-independent expression of the CRISPR/Cas system in *S. Typhi*. Thus, our work provides evidence that there are multiple modulators involved in the genetic expression of this immune system in *S. Typhi* IMSS-1.

In nature, bacteria and archaea are exposed to multiple viral infections; therefore, several strategies have evolved to inhibit phage predation. The mechanisms to avoid phage infection include the prevention of phage adsorption and DNA injection; the abortive infection and modification-restriction systems are also relevant (20, 37). Recently, a novel genetic program designated the CRISPR/Cas system was shown to provide immunity against virus and exogenous DNAs (7, 9, 42). In general, this system consists of a cluster of proteins (Cas) with functional domains of nucleases, helicases, polymerases, and polynucleotide binding proteins (24, 32, 41); a leader of A/T-rich noncoding sequences (31) is located immediately upstream of a singular cluster of regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) that are composed of direct repeats separated by spacers that, in some cases, resemble viral or plasmid DNA (8, 49, 51). Accumulating evidence suggests that the CRISPR sequences are transcribed as a large mRNA which is cleaved in the repeat sequences by a Cas endonuclease protein (9, 11, 26), generating small transcripts (crRNAs) that are used by the Cas proteins to target exogenous genetic materials, leading to their degradation (9, 21, 25, 43). Thus, CRISPR/Cas provides immunity against foreign genetic mate-

rial. The incorporation of new spacers into the CRISPR during a phage challenge has been shown to confer specific resistance against the invading virus in future events (7). The presence of a large assortment of short invader sequences in the CRISPR cluster shows the evolutionary history of multiple viral infections in the host, providing evidence of the rapid evolution of this dynamic program (6, 27).

Significant progress has been made regarding the functionality of the CRISPR/Cas system (30, 34, 44, 61). However, this genetic program is not fully characterized; for instance, there are few studies about its transcriptional organization and genetic control (1, 28, 38, 55, 58, 64). In this regard, we previously reported that in *Salmonella enterica* serovar Typhi IMSS-1, the *casA* gene (STY3070) is regulated positively by LeuO; footprinting experiments demonstrated that LeuO binds upstream of the *casA* transcriptional start site, and by use of transcriptional fusions it was shown that *casA* is induced in an H-NS-deficient strain (28). This finding was later observed in *Escherichia coli* K-12, as electrophoretic mobility shift assays (EMSA) and Northern blot experiments showed that LeuO directly and positively regulates the *casA* (*ycgL*) gene, and in an H-NS-deficient strain overexpressing LeuO, the transcriptional *casA* levels were higher than in the wild type overexpressing this regulator (58). Furthermore, Pul et al. (55) determined the σ^{70} -dependent promoters in the 5' region of *casA*, including a *Pcas* promoter and a divergent anti-*Pcas* promoter as well as another one identified in the leader region upstream of the CRISPR I array (*PcrisprI*). Interestingly, the three promoters are repressed by H-NS. Recently, Westra et al. (64) showed that H-NS-mediated *casA* repression can be relieved by the LeuO transcriptional regulator. Together, these data support

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico. Phone: (52) (777) 329-1627. Fax: (52) (777) 313-8673. E-mail: ismaelh@ibt.unam.mx.

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

∇ Published ahead of print on 11 March 2011.

the positive and negative roles of LeuO and H-NS in the genetic control of the CRISPR/Cas program in *E. coli* K-12. In the present work, we determined that in *S. Typhi* IMSS-1, the complete CRISPR/Cas system is driven by a single LeuO-dependent promoter, which is directly repressed by H-NS and LRP; both proteins bind upstream and downstream of the *casA* transcriptional start site. In addition, we have identified nucleotides of the regulatory region of *casA* that mediate its LeuO-dependent activation. Specific growth conditions that induce the CRISPR/Cas program in *S. Typhi* IMSS-1 in a LeuO-independent manner are also reported, thus demonstrating that multiple global regulators and specific conditions modulate the transcriptional expression of this genetic program in *Salmonella enterica* serovar Typhi.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. The bacterial strains and plasmids used are listed in Table S1 in the supplemental material. *S. Typhi* IMSS-1 was grown in LB (10 g tryptone, 5 g yeast extract, and 10 g NaCl per liter), liquid MA medium (7 g nutrient broth, 1 g yeast extract, 2 g glycerol, 3.75 g K_2HPO_4 , and 1.3 g KH_2PO_4 per liter) (35), or N-minimal medium [5 mM KCl, 7.5 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 mM K_2SO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 μ M $MgCl_2$, 0.5% glycerol, and 0.1% Casamino Acids] (15). When required, the following antibiotics were added: kanamycin (Km), 30 μ g/ml; tetracycline (Tc), 12 μ g/ml; and ampicillin (Ap), 100 μ g/ml. *S. Typhi* and *E. coli* strains were grown aerobically at 37°C.

DNA manipulations. Plasmid and genomic DNA isolation was performed according to published protocols (57). Primers for PCR amplifications were provided by the oligonucleotide synthesis facility at our institute (see Table S2 in the supplemental material). Restriction enzymes, ligase, nucleotides, and polymerases were obtained from New England BioLabs or Gibco BRL. For sequencing, double-stranded DNA was purified with a High Pure plasmid isolation kit (Boehringer Mannheim, Germany), and sequencing was performed with an automatic Perkin Elmer/Applied Biosystems 377-18 system.

Northern analysis. Total RNA was collected from 10 ml of culture by acid-phenol extraction. RNAs were separated in 1% agarose gels, transferred to nylon membranes (GE Healthcare), and probed with PCR probes labeled with a Rediprime kit using $[\alpha\text{-}^{32}P]dCTP$. The membranes were prehybridized and hybridized at 65°C, using Rapid Hyb buffer (GE Healthcare), and were washed with 2 \times SSC (1 \times SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate) plus 0.1% SDS for 15 min, 1 \times SSC plus 0.1% SDS for 15 min, 0.5 \times SSC plus 0.1% SDS for 15 min, and, finally, 0.1 \times SSC plus 0.1% SDS at 65°C for 30 min (57). To determine the molecular weight of the mRNA, a 0.24- to 9.5-kb RNA ladder (Invitrogen) was used.

Construction of transcriptional reporter fusions. Oligonucleotides (see Table S2 in the supplemental material) were designed to PCR amplify the complete 5' intergenic region as well as shorter fragments of different lengths of the *casA* regulatory region. PCR fragments were double digested with BamHI-XhoI or BamHI-KpnI and ligated into pKK232-8 or pKK232-9 (see Table S1 in the supplemental material), which contains the promoterless *cat* gene. Fusions were sequenced to verify the correct DNA sequences of the PCR fragments.

CAT assay. Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assays were performed as follows (46). *S. Typhi* strains were grown in MA medium supplemented when required with Ap or Km, with or without IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; 50 μ M), to optical densities at 595 nm (OD_{595}) of 0.4, 0.6, 0.8, 1, and 1.3; at these times, 1.5 ml of bacterial culture was collected by centrifugation and washed with 0.8 ml of TDDT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 30 μ M DL-dithiothreitol). Bacterial cells were resuspended in 0.6 ml of TDDT and sonicated on ice for 10-s intervals with 10-s rest periods until the extract was clear. The homogenate was centrifuged, and the supernatant was used for activity measurement. For CAT assays, 5 μ l of each extract was added in duplicate to a 96-well enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate, followed by the addition of 0.2 ml of a reaction mixture containing 1 mM DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)], 0.1 mM acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA), and 0.1 mM chloramphenicol in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8. The absorbance at 412 nm was measured every 5 s for 5 min, using a Ceres 900 scanning autoreader and microplate workstation. The protein concentration of the cell extracts was determined using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent (Pierce). Protein values and the mean rate of product formation by CAT were used to

determine CAT specific activity, in μ mol/min/mg protein. To determine the transcriptional activity in N-minimal medium, the bacteria were grown for 16 h, 1 ml was collected, and the CAT protocol described above was used. The results presented in the figures are the means for three independent experiments performed in duplicate.

Purification of H-NS and LRP proteins. H-NS and LRP proteins were purified as described previously (16). Briefly, the genes were cloned into the arabinose-inducible vectors pBAD/Myc-His and pMPM-T6, respectively (Invitrogen) (47). *E. coli* BL21(DE3) harboring the cloned gene was grown overnight in LB medium. One milliliter of this preculture was inoculated into 100 ml LB medium and allowed to grow to an OD_{600} of 0.4 before being induced for 4 h with L-arabinose (Sigma-Aldrich) to a final concentration of 1%. Samples were collected and centrifuged at 8,000 rpm (Thermo Scientific CL31R multispeed centrifuge) for 5 min at 4°C. The cell pellet was resuspended in binding buffer (8 M urea, 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, pH 8.0), the cells were sonicated, and the suspension was centrifuged at 12,000 rpm for 5 min at 4°C and kept at 4°C.

A nickel affinity chromatography column (Ni-nitrilotriacetic acid [Ni-NTA] agarose; Qiagen) was equilibrated with binding buffer, the solution containing the protein was loaded onto the column and washed with 10 volumes of urea buffer at pH 8.0 and urea buffer at pH 6.0, and the bound protein was eluted with urea buffer, pH 4.5. Fractions containing H-NS-Myc-His₆ or Lrp-His₆ were resolved by SDS-PAGE. The selected fractions were loaded into a Slide-A-Lyzer 10K cassette (Pierce) and gradually dialyzed at 4°C in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$, 20% glycerol, 500 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, and 4 M urea. The same buffer containing different amounts of urea (1 M and 0.2 M) was used to complete the dialysis. The proteins were stored in buffer containing 30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$, 20% glycerol, 500 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, and 3 mM EDTA. Protein concentrations were determined by the Bradford procedure.

Gel EMSA. Nonradioactive EMSAs were performed according to a previously described protocol (16). The probes were obtained by PCR, using the primers described in Table S2 in the supplemental material. Each probe (100 ng) was mixed with increasing concentrations of purified protein in the presence of 10 \times H-NS binding buffer (400 mM HEPES, 80 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl, 10 mM DTT, 0.5% NP-40, and 1 mg/ml bovine serum albumin [BSA]) or 5 \times LRP buffer (100 mM Tris, pH 8.0, 2 mM EDTA, 250 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 62.5% [vol/vol] glycerol, 500 mg/ml BSA, and 0.5 mM DTT). The mixture was incubated for 20 min at room temperature and then separated by electrophoresis in 6% or 5% native polyacrylamide gels in 0.5 \times Tris-borate-EDTA buffer. The DNA bands were visualized by ethidium bromide staining.

Site-directed mutagenesis. To analyze their role in the regulation of the CRISPR/Cas system in *S. Typhi* IMSS-1, LRP-, H-NS- (19), and double H-NS/LRP-deficient strains were obtained. The corresponding genes were deleted by a one-step nonpolar gene inactivation procedure and replaced with selectable antibiotic resistance gene markers (14). Different primer sets were used to verify the presence of the antibiotic resistance gene cassette. Each mutation was further characterized by sequencing to verify the authenticity of the deletion and the presence of the resistance marker.

Nucleotide sequence accession numbers. The *casA-cas2* and CRISPR sequences of *S. Typhi* IMSS-1 were deposited in the DDBJ database under accession number HQ655820.

RESULTS

A LeuO-dependent promoter is necessary to transcribe the complete CRISPR/Cas operon in *Salmonella enterica* serovar Typhi IMSS-1. The CRISPR/Cas cluster is found in many prokaryotic genomes, including those of the *Enterobacteriaceae*. In *Salmonella enterica* serovar Typhi IMSS-1, a Mexican clinical strain (52), we detected the presence of a CRISPR/Cas system that resembles the type E (Cse) system found in *S. Typhi* CT18 and *S. Typhi* Ty2 (22, 24), and in this study we analyzed its transcriptional expression. The IMSS-1 cluster contains a 356-bp intergenic 5'-regulatory region and eight *cas* genes (STY3071 and STY3070-STY3069-STY3068-STY3067-STY3066-STY3065-STY3064) that are orthologous to *cas3* and *casA-casB-casC-casD-casE-casI-cas2* in *E. coli* K-12 (9). It also has an 84-bp leader and the CRISPR I sequences, which contain seven 29-bp repeats and six 32-bp spacers (Fig. 1A);

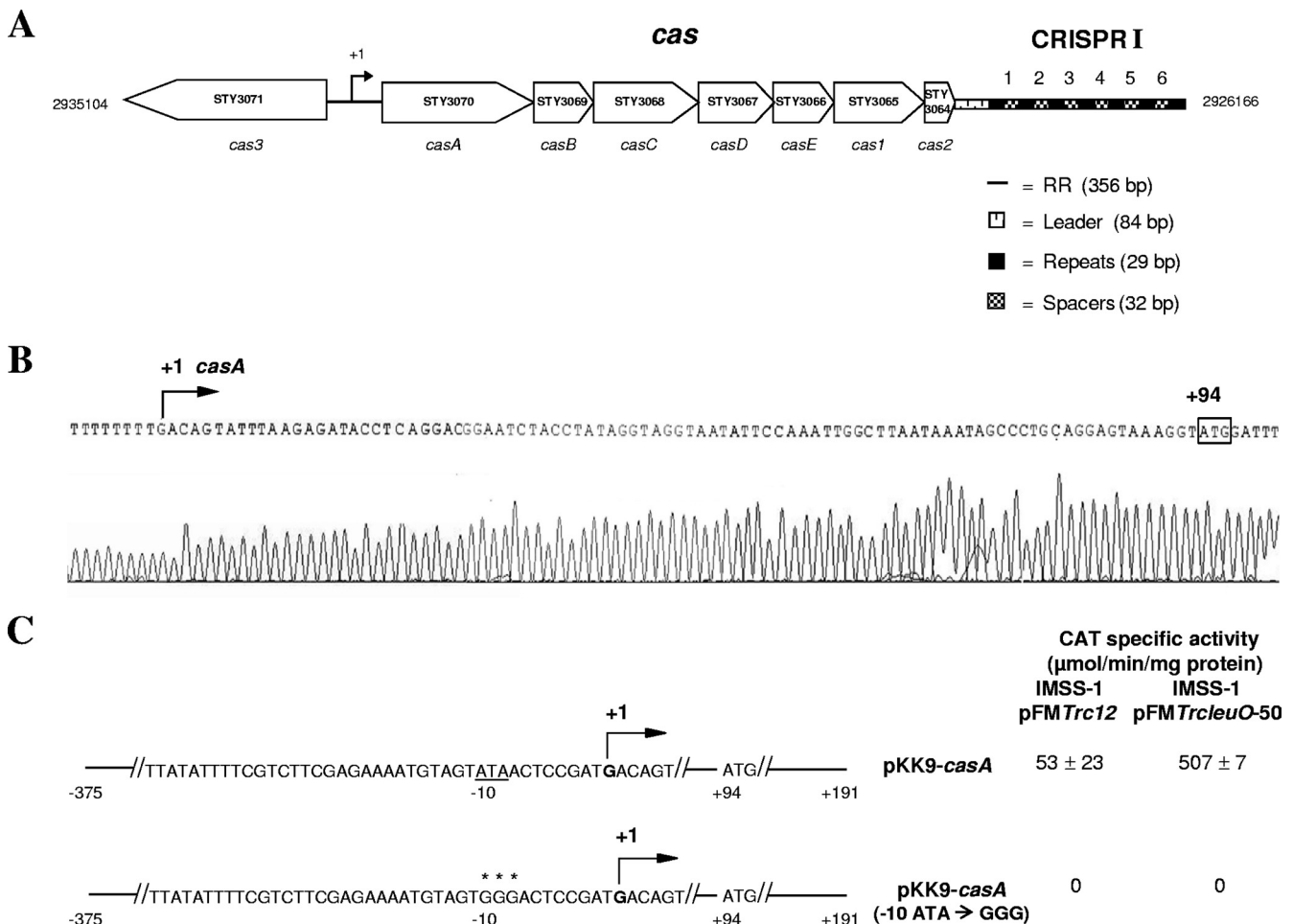


FIG. 1. Genetic organization of the CRISPR/Cas immune system in *S. Typhi* IMSS-1 and identification of the transcriptional start site of *casA* (STY3070). (A) The CRISPR/Cas system is composed of a 5'-regulatory region (RR) of 356 bp, eight genes (*cas3* and *casA-casB-casC-casD-casE-cas1-cas2*), a leader of 84 bp, and the CRISPR I array, containing seven repeats and six spacers. The bent arrow indicates the STY3070 (*casA*) transcriptional start site. The divergent STY3071 (*cas3*) gene is also represented. (B) Mapping of the chromosomal transcriptional start site of the *casA* gene. A 5'-RACE experiment was performed using total RNA from *S. Typhi* harboring the pFMTrcleuO-50 plasmid and induced with 50 μM IPTG. The nucleotide immediately after the polynucleotide tail (T) corresponds to the transcriptional start site (bent arrow), located 94 bp upstream of the ATG translational start codon of *casA*. (C) Site-directed mutagenesis of the -10 box of *casA* was performed by use of a QuikChange Multi site-directed mutagenesis kit (Stratagene), and the wild-type ATA sequence (underlined) was replaced by a GGG sequence (asterisks); the mutation was verified by sequencing. The CAT activities of the wild-type plasmid pKK9-*casA* and the pKK9-*casA* (-10 ATA \rightarrow GGG) plasmid were determined in the wild-type *S. Typhi* strain overexpressing the pFMTrcleuO-50 plasmid with 50 μM IPTG as well as in *S. Typhi* containing the pFMTrc12 plasmid.

the repeats are identical to those found in *S. Typhi* CT18 and *E. coli* K-12. Analysis of the spacers by use of the Blastn algorithm (3) against a database of phage and virus sequences downloaded from the DDBJ data bank (33) showed no significant similarity with any sequence in the database. In this work, the *S. Typhi cas* genes were named according to their orthologs in *E. coli*.

Previously, we reported the results of primer extension experiments showing that the *S. Typhi casA* (STY3070) regulatory region contains two LeuO-dependent transcription initiation sites, located 94 and 84 bp upstream of the translational ATG start codon (28). To confirm the primer extension results, 5' rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) was performed according to the method of Mendoza-Vargas et al. (48). Briefly, total RNA from the *S. Typhi* IMSS-1 wild-type

strain harboring the pFMTrcleuO-50 plasmid (pFMTrc12 derivative plasmid carrying *leuO* behind an IPTG-inducible *P_{trc}* promoter [see Table S1 in the supplemental material]) (18) and induced with 50 μM IPTG was randomly amplified, and in the resulting cDNA, an adapter (homopolynucleotide of A nucleotides) was incorporated by a terminal transferase. This cDNA was used with an oligonucleotide of T nucleotides and specific *casA* primers in a PCR, and the PCR products were purified and sequenced. The results showed that a single chromosomal transcriptional site located 94 bp upstream of the ATG was the only one detected by 5'-RACE (Fig. 1B). Site-directed mutagenesis was performed to modify the -10 sequence (ATA \rightarrow GGG) of the *casA* initiation site. PCR fragments that contained the entire *casA* regulatory region as well as the -10 substitutions were fused to the *cat* reporter gene,

TABLE 1. The CRISPR/Cas cluster comprises a LeuO-dependent operon in *S. Typhi*^a

Plasmid	CAT sp act ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	
	IMSS-1/pFM <i>Trc12</i>	IMSS-1/pFM <i>TrcleuO-50</i>
pKK9-RR- <i>casA-cas2</i>	36 \pm 3	273 \pm 5
pKK9- Δ RR- <i>casA-cas2</i>	0	0
pKK9-RR- <i>casA</i> -CRISPR	8 \pm 11	137 \pm 0.6

^a Transcriptional values for the LeuO-dependent *casABCDE12*-CRISPR operon were determined in MA medium. The plasmids pKK9-RR-*casA-cas2*, pKK9- Δ RR-*casA-cas2*, and pKK9-RR-*casA*-CRISPR were introduced into IMSS-1 harboring plasmid pFM*Trc12* and IMSS-1 containing plasmid pFM*TrcleuO-50*. The CAT specific activity of each strain was determined using samples collected at OD₅₉₅ values of 0.4, 0.6, 0.8, and 1 and at 12 h; the values presented are the results obtained at 12 h. IPTG (50 μM) was used to induce the pFM*TrcleuO-50* plasmid. Data are means \pm standard deviations for three independent experiments performed in duplicate.

producing plasmids pKK9-*casA* and pKK9-*casA* (-10 ATA \rightarrow GGG), respectively, which were introduced into the *S. Typhi* IMSS-1 strain containing pFM*Trc12* (a p*Trc99A*[5] derivative containing the p15A1 origin of replication) or pFM*TrcleuO-50* (see Table S1). Experiments with these fusions showed that the overexpression of LeuO induced the transcriptional activity of *casA*, while no CAT activity in the presence of LeuO was observed with the -10 box substitutions, indicating that a unique LeuO-dependent promoter controls the genetic expression of *casA* in *S. Typhi* IMSS-1 (Fig. 1C).

These results prompted us to determine whether the complete CRISPR/Cas system is a LeuO-dependent operon. To resolve this issue, a large DNA fragment harboring the *casA* promoter region and the entire *casA*-to-*cas2* gene cluster (6.15 kb) was first fused to the *cat* reporter gene, creating plasmid pKK9-RR-*casA-cas2*. This fusion was evaluated in an *S. Typhi* IMSS-1 wild-type strain harboring the control vector pFM*Trc12* or the pFM*TrcleuO-50* plasmid. The transcriptional results with pKK9-RR-*casA-cas2* showed minimal activity in the absence of LeuO, while in the presence of LeuO the transcriptional activity increased notably (Table 1). The fusion plasmid pKK9- Δ RR-*casA-cas2*, which contains the same genetic elements but is devoid of the *casA* promoter region, showed null CAT activity in either the absence or presence of LeuO (Table 1). These data support the notion that *casABCDE12* is a LeuO-dependent operon. To elucidate whether CRISPR is part of the *casABCDE12* LeuO-dependent operon, the fusion plasmid pKK9-RR-*casA*-CRISPR (6.7 kb), containing the *casA* promoter region, the *casA* to *cas2* genes, and the CRISPR sequences, was constructed and independently introduced into IMSS-1/pFM*Trc12* and IMSS-1/pFM*TrcleuO-50*. In the absence of LeuO, only residual activity was observed, which notably contrasted with the transcriptional activity detected with LeuO overexpression (Table 1). A fusion of the complete 5' intergenic region of the CRISPR was constructed, and no activity was observed in the presence or absence of LeuO (data not shown). These results indicate that the complete CRISPR/Cas system in *S. Typhi* comprises a LeuO-dependent operon. The pKK9-*casA*, pKK9-RR-*casA-cas2*, and pKK9-RR-*casA*-CRISPR reporter fusions showed 507 (Fig. 1), 272 (Table 1), and 136 (Table 1) activity units, respectively, with LeuO overexpression. Interestingly, a gradual decrease in activity from *casA* to *cas2* was also found in the

presence of LeuO in *E. coli* K-12 (64). The data presented above support the notion that in *S. Typhi* IMSS-1 a single LeuO-dependent promoter drives CRISPR/Cas expression.

The expression of the LeuO-dependent CRISPR/Cas operon was also analyzed by chromosomal reverse transcription-PCR (RT-PCR). Total RNA isolated from the wild-type strain harboring pFM*TrcleuO-50* and induced with IPTG was used with a specific CRISPR primer (CRISPR-R) located at the end of repeat 7 (see Table S2 in the supplemental material) to obtain a cDNA (6 kb) that included the complete *casABCDE12*-CRISPR operon. Using this template, *casA-casC*- and *casC-cas2*-specific primers were used to amplify the corresponding DNA fragments. The results showed that 2.9-kb and 3.4-kb fragments, containing the *casA-casC* and *casC-cas2* regions, respectively, were amplified (Fig. 2A), further supporting the LeuO-dependent operon structure. Northern experiments were also performed to support the CRISPR/Cas operon organization. Total RNAs from the bacterial strains IMSS-1/pFM*Trc12*, IMSS-1/pFM*TrcleuO-50*, and IMSS-1 Δ (*casA*-CRISPR) were obtained. The RNAs were transferred, and independent membranes were hybridized with an

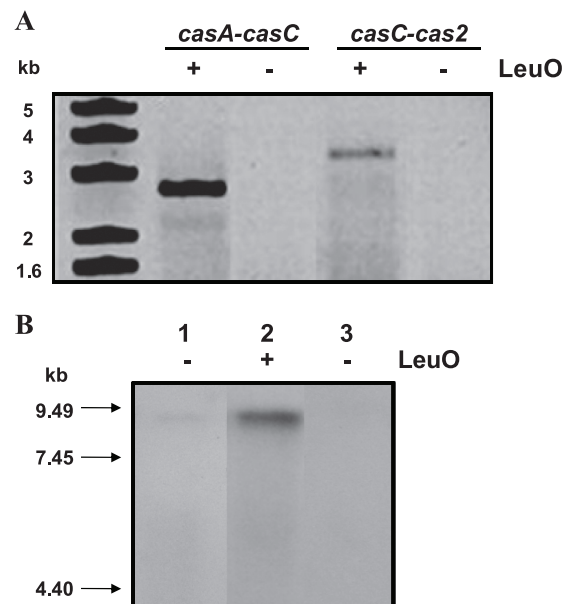


FIG. 2. The CRISPR/Cas cluster comprises a LeuO-dependent operon in *S. Typhi*. (A) The genetic organization of the LeuO-dependent *casABCDE12*-CRISPR operon was determined by chromosomal RT-PCR. *S. Typhi* IMSS-1 containing either the pFM*TrcleuO-50* or pFM*Trc12* plasmid was grown in MA medium with and without 50 μM IPTG, and total RNA was obtained. A 2.9-kb fragment was generated with *casA*- and *casC*-specific primers, and a 3.4-kb fragment was obtained with *casC*- and *cas2*-specific primers. PCRs using RNAs obtained from the strains mentioned above as templates and specific primers for the amplification of the *cas2* and 16S rRNA genes were performed in order to verify the presence of DNA. As expected, no PCR amplification was observed, indicating the absence of DNA in the RNA purification. The left lane shows a DNA molecular size marker. (B) Detection of CRISPR/Cas mRNA by Northern blotting. Chromosomal expression patterns of CRISPR/Cas mRNAs from the bacterial strains IMSS-1/pFM*Trc12* (lane 1), IMSS-1/pFM*TrcleuO-50* (lane 2), and IMSS-1 Δ (*casA*-CRISPR) (lane 3) are shown. Eight micrograms of total RNA from each sample was loaded and hybridized with an internal CRISPR probe. Sizes of the RNA molecular marker are shown on the left.

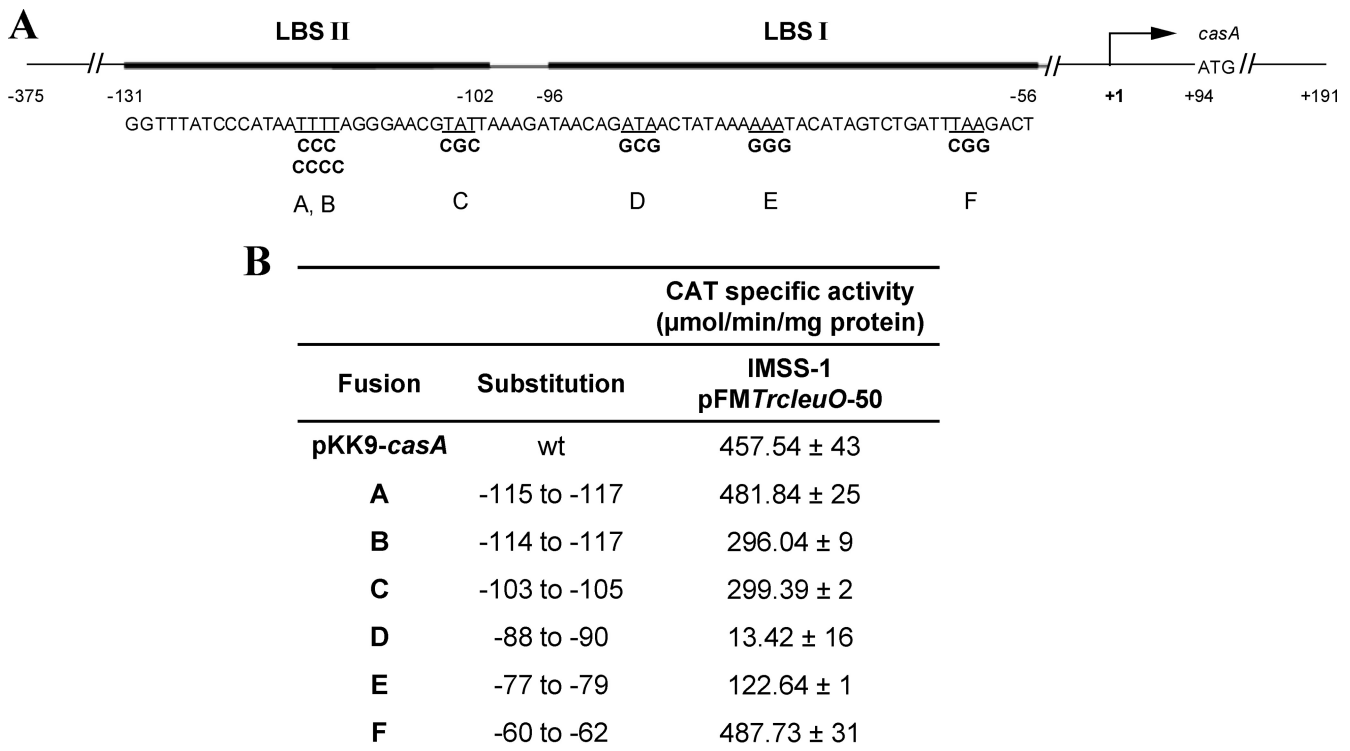


FIG. 3. Mapping of the LeuO recognition sequences in the regulatory region of *casA*. (A) Schematic representation of LBS I and LBS II in the promoter region of *casA*. The entire regulatory region of *casA* was used as a template to obtain mutants in LBS II (A, B, and C) and LBS I (D, E, and F). The substitutions (in bold) were sequenced to verify the correct mutations. The wild-type sequences are underlined. (B) Transcriptional analysis of *casA* promoter fusions with mutations in LBS I and LBS II. *S. Typhi* strain IMSS-1, containing each of the mutations individually as well as the pFMTrcleuO-50 plasmid and induced with 50 μM IPTG, was evaluated for CAT activity. The assays were performed in MA medium at different OD₅₉₅ values, and the activities at 12 h are presented. As a positive control, we used the complete wild-type *casA* promoter region. The data are means \pm standard deviations for three independent experiments performed in duplicate.

internal fragment of the first gene of the operon, the *casA* locus, and with the last part of the operon, the CRISPR sequences. The results showed a null hybridization signal for the *Salmonella* Δ (*casA*-CRISPR) strain, which was devoid of the complete CRISPR/Cas operon; for the IMSS-1/pFMTrc12 strain, a weak signal was detected. In contrast, for the IMSS-1/pFMTrcleuO-50 strain induced with IPTG, a signal of 7 to 9 kb was detected with the *casA* or CRISPR probe. This result demonstrates that the complete CRISPR/Cas system comprises a LeuO-dependent operon. In Fig. 2B, we present only the results obtained with the CRISPR probe, since identical results were obtained with the *casA* probe.

In *E. coli*, the CRISPR/Cas system contains two promoters: the first is a LeuO-dependent promoter (64) located upstream of the *casA* gene, and the second is located in the leader sequence of the CRISPR (55), suggesting that in *E. coli* this system is encoded by two transcriptional units. A comparison between the leader and CRISPR sequences of *E. coli* and *S. Typhi* shows that the leaders differ in length and share a low level of conservation. In fact, the -10 promoter sequence determined for *E. coli* (55) is missing in *S. Typhi* IMSS-1. The low level of conservation in the leader sequences could explain the lack of a CRISPR promoter in *S. Typhi* IMSS-1. It is worth mentioning that in *S. Typhi* and *E. coli* the transcriptional organization of the CRISPR/Cas systems is not conserved, suggesting that the signals or conditions that activate or repress

this genetic program could be different even in these two closely related bacteria.

Determination of the nucleotides involved in LeuO activation of the CRISPR/Cas genetic system in *S. Typhi* IMSS-1. As mentioned above, LeuO is a positive activator of the CRISPR/Cas operon in *S. Typhi*; by footprinting experiments, we showed previously that LeuO binds to nucleotides -56 to -96 (LeuO binding site I [LBS I]) and -102 to -131 (LBS II) with respect to the transcriptional start site of *casA* (STY3070) (28). To determine which nucleotides mediate LeuO activation, a collection of substitutions (A, B, C, D, E, and F) were constructed in LBS I and LBS II (Fig. 3A). Several regions in LBS I and LBS II with high A+T content were replaced by G+C nucleotides, considering that LeuO binds preferentially to sites with high A+T content (12). Reporter gene fusions containing three or four substitutions were introduced into the *S. Typhi* IMSS-1 wild-type strain harboring the pFMTrcleuO-50 plasmid. The transcriptional results showed that in the presence of LeuO, the A and F substitutions (nucleotides -115 to -117 and -62 to -60 , respectively) gave similar expression levels to those with the wild-type fusion (Fig. 3B). However, a gradual decrease in activity was detected with the B and C substitutions (nucleotides -114 to -117 and -103 to -105 , respectively) (Fig. 3B). Interestingly, a decrease of 76% was observed with the E substitution (nucleotides -77 to -79), and only 3% of wild-type activity remained with the D substitution (nucleo-

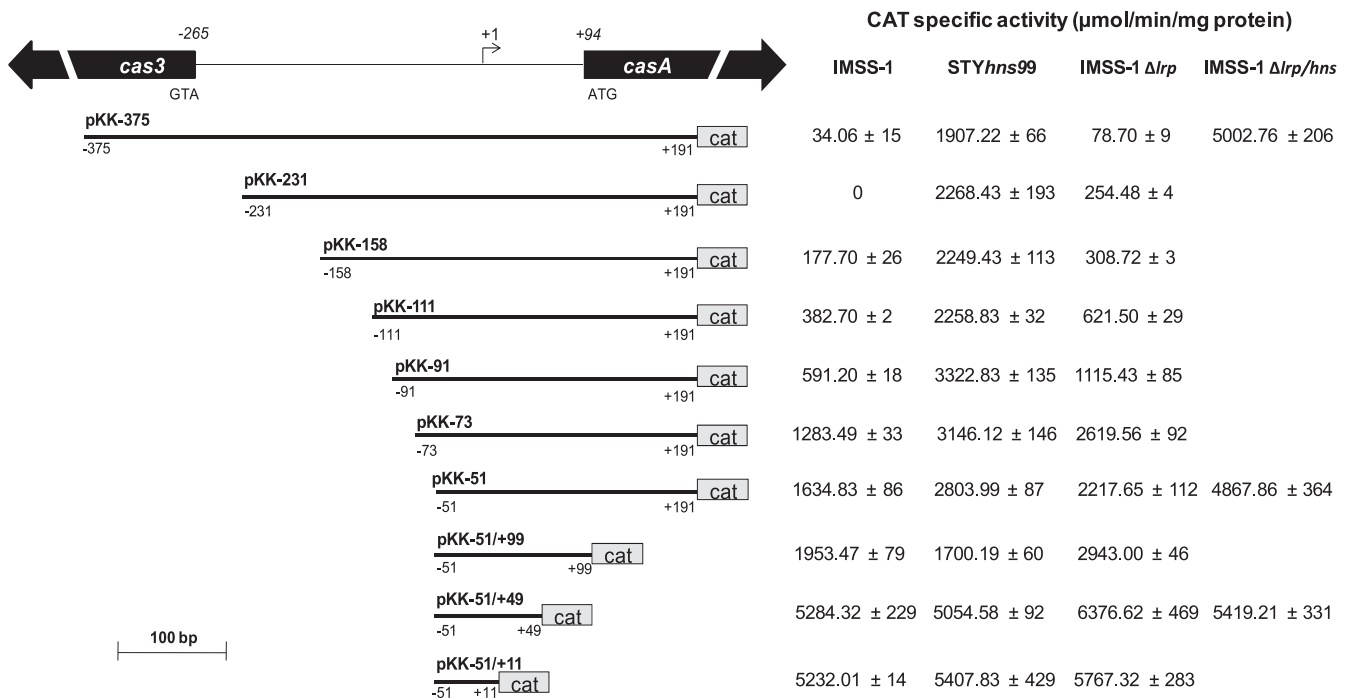


FIG. 4. Promoter fusions harboring different lengths of the *casA* regulatory region. The bent arrow represents the transcriptional start site, located 94 bp upstream of the translational start codon of *casA*; the numbers in italics represent the localization of the *casA* and *cas3* ATG initiation codons relative to the *casA* mRNA start site. Below the diagram of the regulatory region of *casA*, transcriptional fusions are shown. The fusions (in bold) were named according to the transcription initiation site; the numbers below each fusion represent the distances upstream and downstream of the mRNA start site. The right columns represent the expression of the *casA* fusions evaluated in the wild-type *S. Typhi* IMSS-1 strain, the single H-NS (STY*hns99*) and LRP (*Δlrp*) mutants, and the double *Δlrp/hns* mutant strain. The activities were determined at different ODs in rich medium (MA); the data presented correspond to the values obtained at an OD₅₉₅ of 1.3. The values are the means ± standard deviations for at least three independent experiments performed in duplicate.

tides -88 to -90) (Fig. 3B). The same constructs were introduced into the *S. Typhi* Δ*leuO* strain harboring pFMT*rleuO*-50, and CAT activity was determined. The results of a single experiment (data not shown) gave the same level of expression for each mutation as that obtained with the wild-type *S. Typhi* strain, indicating that the chromosomal *leuO* gene did not affect the expression of the fusions evaluated. These data indicate that substitutions B, C, D, and E affected the transcriptional *casA* induction mediated by LeuO, suggesting that both LBS I and LBS II are relevant for *casA* LeuO-dependent induction. It will certainly be interesting to determine the impact of base changes on binding of the LeuO protein to elucidate whether the decrease in activity is because the protein is effectively unable to bind to the DNA or binds it in an ineffective manner.

H-NS partially represses transcriptional expression of the CRISPR/Cas genetic program in *S. Typhi* IMSS-1. H-NS is a master regulator of the *S. Typhi* genome, and significant evidence has been compiled about the role of this protein in the expression of several genes belonging to the LeuO regulon (13, 16, 28, 59, 60). Previously, we used transcriptional fusions to show basal expression of the *casA* (STY3070) promoter region in the wild-type strain. However, transcriptional activity of this fusion was induced in the presence of LeuO as well as in an H-NS-deficient strain, supporting the notion that H-NS negatively regulates the expression of *casA* (STY3070) in *S. Typhi* IMSS-1 (28). To further characterize the *casA* regulatory re-

gion, a series of promoter fragments harboring progressively shorter upstream sequences of the entire promoter region were generated by PCR, and each of these DNA fragments was fused to the *cat* reporter gene in plasmid pKK232-8 (Fig. 4). The expression levels of these derivatives were examined by CAT activity assay of the wild-type *S. Typhi* IMSS-1 strain as well as the STY*hns99* H-NS-deficient strain (19) (Fig. 4). The CAT activity levels of all of the single fusions analyzed (from pKK-375, which contains the entire *casA* 5' intergenic regulatory region, to pKK-231, pKK-158, pKK-111, pKK-91, pKK-73, and pKK-51) were higher in the H-NS-deficient strain than in the wild-type strain. These results are consistent with the negative role of H-NS in the genetic expression of *casA* (Fig. 4).

Interestingly, the CAT activity values for the H-NS-deficient strain with the pKK-375, pKK-231, pKK-158, and pKK-111 fusions were between 1,900 and 2,200 activity units, but the values with the pKK-91, pKK-73, and pKK-51 fusions were higher (2,800 to 3,300 activity units), indicating that in these three fusions regions of negative regulation were eliminated (Fig. 4). An increased activity in the wild-type strain was also observed with fusions pKK-91, pKK-73, and pKK-51 compared with the longer fusions pKK-375, pKK-231, pKK-158, and pKK-111, supporting the notion that nucleotides in the region from positions -111 to -51 are recognized by negative regulatory elements, in addition to H-NS, repressing *casA* expression (Fig. 4).

Additional fusions deleting downstream sequences relative

to the transcriptional start site (pKK-51/+11 and pKK-51/+49) showed between 5,000 and 5,200 activity units for the wild type as well as the H-NS mutant strain. However, with the pKK-51/+99 fusion, 1,700 to 1,900 activity units were detected for the wild type and the H-NS mutant, indicating that between nucleotides +49 and +99 with respect to the transcriptional start site, negative regulatory elements repress *casA* expression (Fig. 4). In summary, systematic deletions upstream and downstream of the transcriptional start site of *casA* resulted in increased CAT activity when they were evaluated in an H-NS-deficient strain, indicating that this nucleoid-associated protein partially represses *casA* expression and that other genetic elements in addition to H-NS are involved in the silencing of *casA* in *S. Typhi* IMSS-1.

LRP is a negative regulator of the CRISPR/Cas operon in *S. Typhi* IMSS-1. To further characterize the genetic expression of *casA* in *S. Typhi* IMSS-1 and to identify other putative genetic elements involved in the control of *casA*, a bioinformatic analysis was performed. A set of *casA*-orthologous proteins was constructed using the Blastp algorithm (3, 4); the highest E value and an upper threshold of 10^{-5} were considered to select the orthologous proteins. With this method, we detected a set of 21 *casA*-orthologous proteins, which are present in archaea and in alpha-, delta-, and gammaproteobacteria. The 400-bp sequences upstream of the putative translational start sites of the 21 *casA*-orthologous polypeptides were aligned to eliminate redundant sequences. The resulting 18 upstream sequences were analyzed using the Oligo-Analysis program (62). A search on both strands for motifs with a maximum length of 6 nucleotides was performed. After assembling the patterns discovered by the algorithm, we found diverse motifs. A conserved LRP motif (TAATAAA) was present in 10 of the sequences analyzed, and this motif was compared using the TOM TOM algorithm (23) with those reported in the DPINTERACT (56) and REGTRANSDB v4 (36) databases. The results showed that the TAATAAA pattern was preserved in close conservation with an LRP binding site of *E. coli* in both databases ($P = 0.0080$). Interestingly, LRP motifs were located 221 bp upstream and 66 nucleotides downstream of the *casA* transcriptional start site of *S. Typhi* IMSS-1. We also identified that the LRP pattern in *S. Typhi* Ty2 has the same distribution as that in *S. Typhi* IMSS-1. These findings suggest that the LRP protein is perhaps a *casA* negative regulator, especially considering the site found downstream of the transcriptional start site. In *Methanospirillum hungatei*, two LRP sites are present, 38 and 351 bp upstream of the *casA* ATG translational start codon. In the case of *Granulibacter bethendens*, an LRP motif was located 50 bp upstream of the *casA* translational start site. In *E. coli* K-12 and *E. coli* W3110, two LRP motifs were identified whose positions varied significantly, but all were located upstream of the transcriptional start site. In *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfococcus oleovorans*, and *Marinomonas* MWYL1, an LRP motif was detected ~400 bp upstream of the ATG translational start site. The presence of LRP motifs in the regulatory region of *casA* orthologs belonging to alpha-, delta-, and gammaproteobacteria and to archaea suggested that the LRP protein could be involved in the transcriptional regulation of the CRISPR/Cas system.

To evaluate the role of LRP in the genetic expression of the

casA gene, we constructed an *S. Typhi* IMSS-1 strain deficient in *lrp* by using the method of Datsenko and Wanner (14). Transcriptional fusions of different lengths (Fig. 4) were introduced into the *lrp*-deficient strain, and CAT activity assays were performed. The results showed an increased CAT activity in the LRP-deficient strain relative to that in the wild-type strain for most of the fusions evaluated. The effect was most evident with the pKK-91, pKK-73, and pKK-51 fusions (Fig. 4), suggesting a negative role for LRP in the expression of *casA*.

The activities for the pKK-51/+11 and pKK-51/+49 fusions were 5,232 and 5,284 activity units, respectively, with the wild type, whereas with the LRP-deficient strain, the values obtained were 5,767 and 6,376 activity units, respectively. For the pKK-51/+99 fusion, around 1,900 and 2,900 activity units were observed with the wild type and the LRP mutant, respectively (see Fig. 4 for standard deviation values), again supporting the conclusion that negative regulatory elements between nucleotides +49 and +99 contribute to *casA* repression (Fig. 4). Thus, both LRP and H-NS repress the genetic expression of CRISPR/Cas. To evaluate the roles of both proteins, a double *hns/lrp* mutant was constructed, and transcriptional experiments were performed with the wild type, the single *hns* and *lrp* mutants, and the *hns/lrp* double mutant.

The longer transcriptional fusion pKK-375, which contains the complete 5' intergenic regulatory region of *casA*, and the pKK-51 and pKK-51/+49 fusions were introduced into the strains described above. The pKK-375 fusion in the wild-type strain showed a value of 34 activity units; in the single H-NS mutant, an activity of 1,907 activity units was observed; in the *lrp* single mutant, a value of 78 activity units was detected; and the double *hns/lrp* mutant showed 5,002 activity units, hence demonstrating the role of both LRP and H-NS in the repression of *casA* (see Fig. 4 for standard deviation values). Interestingly, the pKK-51 fusion had values of around 1,600, 2,800, 2,200, and 4,800 activity units in the wild type, the *hns* and *lrp* single mutants, and the double *hns/lrp* mutant, respectively. The activity values obtained with pKK-51/+49 were 5,200 for the wild type, 5,000 for the *hns* mutant, 6,300 for the *lrp*-deficient strain, and 5,400 for the double *hns/lrp* mutant strain (Fig. 4). This indicates that the sequence from nucleotides -51 to +49 contains the complete promoter region, without any negative regulatory elements, since with the wild-type strain we obtained the same activity as that observed with the double H-NS/LRP mutant strain. These data also confirm that the *casA* regulatory region contains two main zones of negative regulation, from nucleotides -51 to -375 and from nucleotides +49 to +99, and that H-NS and LRP are the genetic elements that repress *casA* expression. With the data mentioned above, we also showed that in the presence of H-NS, LRP has a minor effect; nevertheless, in the absence of H-NS, LRP mainly represses *casA* expression (Fig. 4), suggesting that LRP could compensate for the absence of H-NS.

It is interesting that previous studies by Pul et al. (55) indicated that in *E. coli* K-12 the LRP protein did not have a significant effect on the expression of the *casA* gene. Thus, in *E. coli* and *S. Typhi*, the negative control of *casA* expression is exerted differently, indicating that the environmental conditions or proteins that control CRISPR/Cas genetic expression in these two related bacteria could be different.

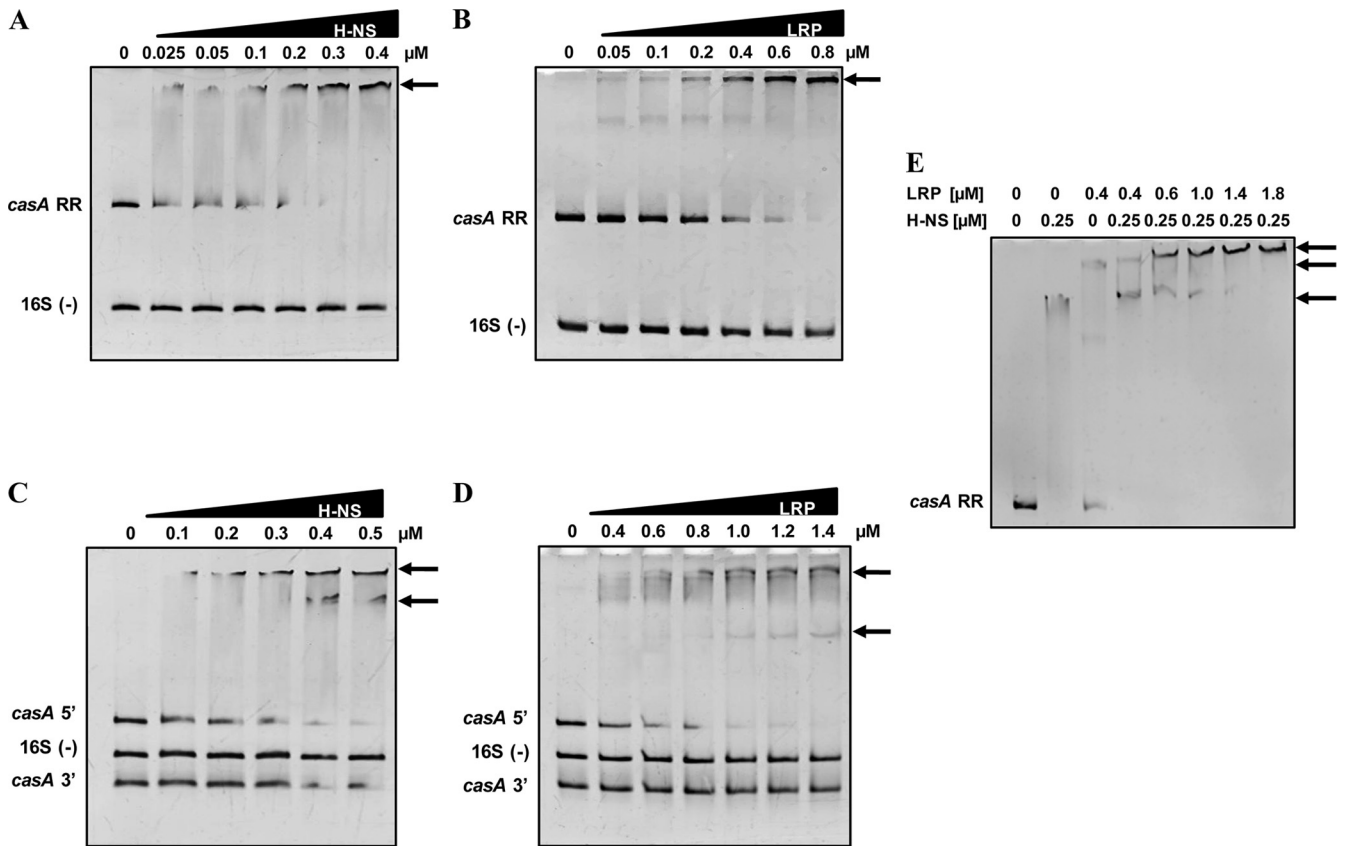


FIG. 5. H-NS and LRP interact with the *casA* regulatory region. EMSAs were performed with the LRP and H-NS purified proteins and with various DNA fragments of the *casA* regulatory region to determine the H-NS and LRP recognition sites. The complete 5' intergenic regulatory region of *casA* (RR) was incubated independently with H-NS (A) or with LRP (B). The *casA* 5' (nucleotides -375 to -52) and 3' (nucleotides +50 to +191) regions were incubated with H-NS (C) or LRP (D), and the *casA* RR was incubated with both proteins (E). Increasing concentrations of purified H-NS-Myc-His₆ or LRP-His₆ protein were incubated with the PCR-generated DNA fragments. The EMSA experiments were performed in 5% or 6% polyacrylamide gels, and gels were stained with ethidium bromide. 16S rRNA gene structural fragments of 242 bp were used as a negative control for the EMSAs. Arrows indicate DNA-protein complexes.

H-NS and LRP directly repress the expression of the *casA* promoter. The data presented above showed that sequences upstream and downstream of the transcription initiation site of *casA* are involved in its silencing and that the genetic regulators involved in this repression are LRP and H-NS. To determine whether these proteins bind upstream and downstream of the initiation site, EMSAs were performed with the corresponding purified proteins and with various fragments of the *casA* promoter region. EMSA using the complete regulatory region of *casA* and the H-NS protein showed that H-NS interacted directly with this fragment, since a single complex was observed (Fig. 5A). In the case of EMSA with LRP and the entire *casA* regulatory region, a predominant complex was observed, supporting the direct interaction of LRP with the *casA* promoter region. A second transient band was also visible; however, it disappeared with increased LRP amounts, and only the predominant complex remained in the retardation gel (Fig. 5B). Further EMSAs showed that H-NS and LRP bound to the 5' *casA* region (nucleotides -51 to -375); interestingly, these proteins also interacted with the 3' *casA* region (nucleotides +49 to +191), since we detected two complexes, the highest corresponding to the 5' region and the lowest to the 3'

fragment's interactions with the respective proteins (Fig. 5C and D). That is, EMSAs with H-NS or LRP in the presence of only the 5' *casA* fragment or the 3' *casA* fragment rendered the complexes mentioned above (not shown). It is noteworthy that no strong binding was observed with LRP and the 3' *casA* fragment in the presence of the 5' *casA* fragment (Fig. 5D), suggesting that the latter has a higher affinity for LRP. The 3' *casA* fragment did bind to LRP at 0.6 μM in the absence of the 5' *casA* fragment (data not shown). As a negative control, in these assays we used a 242-bp coding region of the 16S rRNA gene of *S. Typhi* IMSS-1. These results support the hypothesis that H-NS and LRP bind independently to the 5' and 3' *casA* regulatory regions. However, in order to elucidate if the two regulators are able to interact simultaneously with the *casA* regulatory sequence, EMSAs with both proteins were performed, showing that the H-NS-*casA* complex in the presence of increasing amounts of LRP was modified, with a new band visualized. This novel complex was of a higher mass than those obtained with the H-NS and LRP proteins independently, indicating that both regulators bound simultaneously to the same fragment of DNA (Fig. 5E). It is relevant to mention that although the two proteins interacted with

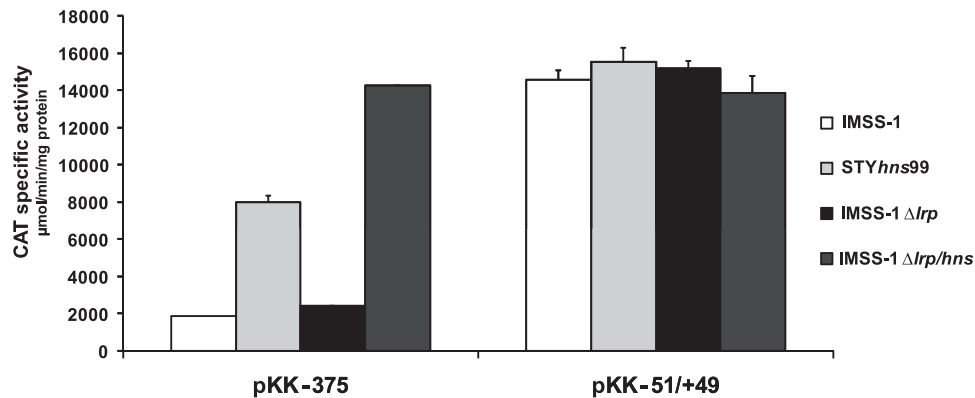


FIG. 6. Transcriptional profile of the *casA* promoter region in N-minimal medium. The expression profiles of the pKK-375 and pKK-51/+49 fusions were evaluated in the wild-type *S. Typhi* IMSS-1, STYhns99, IMSS-1 Δ lrp, and IMSS-1 Δ lrp/hns strains. The activities were determined at 16 h in N-minimal medium. The values are the means and standard deviations for at least three independent experiments performed in duplicate.

the same fragment, they did not appear to displace each other, thus demonstrating the simultaneous involvement of H-NS and LRP in the repression of the CRISPR/Cas system in *S. Typhi*.

The CRISPR/Cas genetic system is induced in *S. Typhi* IMSS-1 grown in N-minimal medium. The CRISPR/Cas immune system is widely distributed in prokaryotes; however, few studies point out the natural conditions that induce its expression. Therefore, it is of interest to investigate the signals or conditions that activate this genetic system. For *S. Typhi*, the selective capture of genes expressed in macrophages showed that the third component of the CRISPR/Cas system, STY3068 (*casC* ortholog), is induced under these conditions (17), and according to Deiwick et al. (15), a minimal medium deficient in magnesium and phosphate simulates the environmental niche encountered by *Salmonella* in the eukaryotic cell, since several genes of *Salmonella* pathogenicity island 2 that are relevant to the survival of this pathogen inside macrophages are induced in this medium (10).

To elucidate whether the *S. Typhi* CRISPR/Cas program is induced under conditions that simulate the environment inside the macrophage, the expression of the *casA* regulatory region was evaluated in N-minimal medium. The results showed that in N-minimal medium, the pKK-375 fusion gave 1,800 activity units in the wild-type strain, while its activity was only 34 activity units in rich MA medium (Fig. 4 and 6). Interestingly, in N-minimal medium, we observed that the expression values for the pKK-375 fusion in the *hns* and *lrp* single null and double *hns/lrp* null strains were 8,000, 2,400, and 14,000 activity units, respectively, supporting the negative role of H-NS and LRP in the transcriptional expression of *casA* in N-minimal medium (Fig. 6). In the wild type and the *hns*, *lrp*, and double *hns/lrp* mutants, the activity values for the pKK-51/+49 fusion (which contains the promoter region without *cis*-acting negative elements) were around 14,000 to 15,000 (Fig. 6), supporting the conclusion that H-NS and LRP are the main repressors of *casA* expression.

To determine the promoter that activates the expression of *casA* in N-minimal medium, 5'-RACE experiments were performed. RNA from the wild-type strain grown in N-minimal medium was obtained, and a specific primer (*casA* 5'-RACE)

located 83 bp downstream of the ATG initiation codon of *casA* was used for the determination of the transcription initiation site (see Table S2 in the supplemental material). The experiment showed that for cells grown in N-minimal medium, a transcriptional start site was located 94 bp upstream of the ATG translational codon. Interestingly, this initiation site coincides with the LeuO-dependent transcriptional site observed in rich medium (MA medium). These data indicate that transcriptional expression in MA medium in the presence of overexpressed LeuO, as well as that in N-minimal medium in the absence of overexpressed LeuO, is driven by the same promoter. Additional experiments validated this assertion, since with a fusion that harbors a mutation in the Pribnow box [pKK9-*casA* (-10 ATA \rightarrow GGG)] of the transcriptional start site of *casA*, null CAT activity was detected in the presence of LeuO in either MA medium or N-minimal medium (data not shown). Furthermore, a fusion of 62 bp (nucleotides -51 to +11), which contained 51 and 11 bp upstream and downstream, respectively, of the transcription initiation site of *casA*, showed activity values of 5,232 (Fig. 4) and 16,470 (data not shown) in rich and minimal medium, respectively, supporting the idea that a common promoter drives *casA* expression in both media. To determine whether LeuO is the *casA* activator in N-minimal medium, the pKK-375 fusion was introduced into the IMSS-1 Δ leuO strain: we found that LeuO does not induce *casA* expression in N-minimal medium, since the activity values in the *leuO*-deficient strain were the same as those in the wild-type strain (data not shown). However, LeuO could increase transcriptional activity in N-minimal medium, as overexpression of the *leuO* gene resulted in a 2-fold induction of *casA* transcription compared to an absence of overexpression in the wild-type *Salmonella* strain (data not shown). These data support the role of LeuO in N-minimal medium and MA rich medium as an inducer of *casA* expression. However, *casA* can also be expressed in a LeuO-independent mode in N-minimal medium, which reveals that additional regulators are needed to fully activate *casA* under these conditions. Future research is needed to identify the full repertoire of genetic elements that control *casA* activation in both N-minimal medium and MA medium.

DISCUSSION

Three distinct stages are involved in CRISPR/Cas functionality: integration of the spacers, expression of CRISPR/Cas, and interference with the foreign DNA. In this study, we analyzed the transcriptional expression of the CRISPR/Cas system in *S. Typhi* IMSS-1. Previously, we reported that two putative promoters control *casA* expression in *S. Typhi* IMSS-1 and that the initiation sites are located 94 and 84 bp upstream of the ATG translational start codon (28). In this work, we performed 5'-RACE experiments that showed a single chromosomal transcription initiation site (Fig. 1B). By site-directed mutagenesis of the -10 box, we demonstrated that a unique $+1$ mRNA is located 94 bp upstream of the ATG translational start codon of *casA* (Fig. 1C). The promoter region reported in this work is induced in the presence of the global regulator LeuO. Site-directed mutagenesis of the LeuO binding sites supports the positive role of this protein in the expression of *casA*, and we showed that both LBS I and LBS II are determinants of LeuO induction. Interestingly, the ATA bases located at positions -88 to -90 (LBS I) are key for LeuO activation (Fig. 3B). Previously, we demonstrated that a TATgTcATAT region located at positions -125 to -134 with respect to the transcriptional start site was necessary for the LeuO induction of the *ompS1* gene (16). These data provide evidence that this regulator does not necessarily recognize a consensus sequence (28). Additional efforts are needed to elucidate the rules that LeuO follows for DNA recognition and transcriptional activation.

Using transcriptional fusions, RT-PCR, and Northern experiments, we demonstrated that the entire CRISPR/Cas system is induced as a large polycistronic mRNA in rich medium in the presence of LeuO, supporting an operon organization (Table 1; Fig. 2) that forms part of the LeuO regulon in *S. Typhi*. Interestingly, Northern blot experiments with *E. coli* showed that the *casA-casB-casC-casD-casE-casI-cas2* genes are part of one transcriptional unit (58). It has also been reported by Pul et al. (55) that the CRISPR sequences contain their own promoter in *E. coli*. Thus, in contrast to the CRISPR/Cas operon organization in *S. Typhi*, *E. coli* has two transcriptional units, one driving the genetic expression of *casABCDEI2* and the other inducing CRISPR transcription. This result provides evidence that the genetic control of the CRISPR/Cas program is highly regulated in the *Enterobacteriaceae* and that even in two closely related bacteria, such as *S. Typhi* and *E. coli*, the functional transcriptional organization is different, raising the possibility that the CRISPR/Cas system can be fine-tuned in response to multiple environmental inputs.

Various studies have shown that genes upregulated by LeuO are downregulated by H-NS (28, 29, 39, 40, 58, 64). A recent report showed that *casA* and CRISPR expression is repressed independently by H-NS in *E. coli* (55). In contrast, in the case of *S. Typhi* IMSS-1, a fusion containing the leader and the CRISPR locus showed no effect in an H-NS-deficient strain (data not shown), while H-NS repression was observed in the transcriptional expression of *casA*. These data again point out the differences in CRISPR/Cas transcriptional control in *E. coli* versus *S. Typhi*. Another notable difference is the finding that the global regulatory protein LRP is a negative repressor of *casA* in *S. Typhi* (Fig. 4), while Pul et al. (55) reported that

LRP did not have a significant effect on the expression of the *cas* genes in *E. coli*.

The involvement of H-NS, LRP, and a LysR-type regulator in the control of other *Salmonella* genes has been documented. For instance, the *spv* virulence genes are positively regulated by the LysR-type regulator SpvR and repressed by H-NS and LRP (45, 50). A negative role of H-NS and LRP is also reported for the 16S rRNA genes, where it is postulated that these proteins bind upstream and downstream of the transcription initiation site and work together in a synergic fashion to repress the expression of the 16S rRNA genes (53, 54). Similar to these studies, we found that H-NS and LRP bind upstream and downstream of the transcription initiation site to repress *casA* (Fig. 5C and D). Interestingly, both proteins appear to simultaneously bind the *casA* regulatory region (Fig. 5E), and it is possible that a nucleosome structure formed between H-NS, LRP, and the target promoter is needed to exert repression of CRISPR/Cas, as suggested for the 16S rRNA repression mediated by H-NS and LRP (53, 54).

Future research is needed to elucidate the fine-tuning mechanism of *casA* repression mediated by H-NS and LRP, and it would also be interesting to determine how LeuO in the presence of these proteins induces *casA* activity. The transcriptional results in the absence of H-NS and LRP showed *casA* activity values of around 5,000 in MA medium (Fig. 4), while the expression value obtained in the presence of LeuO was only 500 (Fig. 1C), indicating that LeuO moderately induces *casA* transcriptional expression and that some additional positive regulatory elements or signals are needed to obtain its complete induction. We also found that the *casA* promoter region is highly induced in N-minimal medium, in a LeuO-independent manner (Fig. 6). Nevertheless, LeuO can also enhance *casA* activity in N-minimal medium if it is overexpressed from a synthetic promoter.

The participation of global regulatory proteins such as LeuO, H-NS, and LRP, which have been implicated in virulence metabolism and other biological processes, suggests that the CRISPR/Cas system responds to a wide variety of environmental cues. It was reported that the CRISPR/Cas program is involved in sporulation in *Myxococcus xanthus* (63) and in biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* (65) and also that housekeeping genes can be targets of CRISPR interference (2). The fact that the CRISPR/Cas system is induced under stress conditions such as growth in N-minimal medium suggests that it could have a role in pathogenesis. Further studies of mutants inactivated in the *cas* genes are needed to evaluate their role in infection and virulence in *Salmonella*.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants to I.H.-L. from DGAPA/UNAM (IN214808) and CONACYT (89337 and 127298) and by grants from CONACYT, México (82383), and DGAPA-UNAM (216310) to E.C.

We thank S. J. Jaime-Rodríguez, M. L. Zavala-García, N. Becerra-Lobato, F. J. Santana, M. Fernández-Mora, P. Gaytan, E. Bustos, S. Becerra, J. Yañez, and J. A. Ramirez-Trujillo for technical help and A. Gutierrez-Preciado, A. Medrano-López, J. M. Villarreal, M. A. De la Cruz, R. Oropeza, J. Caballero, M. Dunn, and J. Miranda for critical readings of the manuscript and stimulating discussions.

REFERENCES

- Agari, Y., et al. 2010. Transcription profile of *Thermus thermophilus* CRISPR systems after phage infection. *J. Mol. Biol.* **395**:270–281.
- Aklujkar, M., and D. R. Lovley. 2010. Interference with histidyl-tRNA synthetase by a CRISPR spacer sequence as a factor in the evolution of *Pelobacter carbinolicus*. *BMC Evol. Biol.* **10**:230.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403–410.
- Altschul, S. F., et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389–3402.
- Amann, E., O. Birgit, and A. Karl-Josef. 1988. Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69**:301–315.
- Andersson, A. F., and J. F. Banfield. 2008. Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. *Science* **320**:1047–1050.
- Barrangou, R., et al. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**:1709–1712.
- Bolotin, A., B. Quinquis, A. Sorokin, and S. D. Ehrlich. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* **151**:2551–2561.
- Brouns, S. J., et al. 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* **321**:960–964.
- Bustamante, V. H., et al. 2008. HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:14591–14596.
- Carte, J., R. Wang, H. Li, R. M. Terns, and M. P. Terns. 2008. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev.* **22**:3489–3496.
- Chen, C. C., et al. 2003. LeuO-mediated transcriptional derepression. *J. Biol. Chem.* **278**:38094–38103.
- Chen, C. C., M. Y. Chou, C. H. Huang, A. Majumder, and H. Y. Wu. 2005. A cis-spreading nucleoprotein filament is responsible for the gene silencing activity found in the promoter relay mechanism. *J. Biol. Chem.* **280**:5101–5112.
- Datsenko, K., and B. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:6640–6645.
- Deiwick, J., T. Nikolaus, S. Erdogan, and M. Hensel. 1999. Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol. Microbiol.* **31**:1759–1773.
- De la Cruz, M. A., et al. 2007. LeuO antagonizes H-NS and StpA-dependent repression in *Salmonella enterica* *ompS1*. *Mol. Microbiol.* **66**:727–743.
- Faucher, S. P., R. Curtiss III, and F. Daigle. 2005. Selective capture of *Salmonella enterica* serovar Typhi genes expressed in macrophages that are absent from the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genome. *Infect. Immun.* **73**:5217–5221.
- Fernández-Mora, M., J. L. Puente, and E. Calva. 2004. OmpR and LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* serovar Typhi *ompS2* porin gene. *J. Bacteriol.* **186**:2909–2920.
- Flores-Valdez, M. A., J. L. Puente, and E. Calva. 2003. Negative osmoregulation of the *Salmonella ompS1* porin gene independently of OmpR in an *hns* background. *J. Bacteriol.* **185**:6497–6506.
- Forde, A., and G. F. Fitzgerald. 1999. Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**:89–113.
- Garneau, J. E., et al. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* **468**:67–71.
- Grissa, I., G. Vergnaud, and C. Pourcel. 2007. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res.* **35**:W52–W57.
- Gupta, S., J. A. Stamatoyannopoulos, T. L. Bailey, and W. S. Noble. 2007. Quantifying similarity between motifs. *Genome Biol.* **8**:R24.
- Haft, D. H., J. Selengut, E. F. Mongodin, and K. E. Nelson. 2005. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput. Biol.* **1**:e60.
- Hale, C. R., et al. 2009. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell* **139**:945–956.
- Haurwitz, R. E., M. Jinek, B. Wiedenheft, K. Zhou, and J. A. Doudna. 2010. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science* **329**:1355–1358.
- Heidelberg, J. F., W. C. Nelson, T. Schoenfeld, and D. Bhaya. 2009. Germ warfare in a microbial mat community: CRISPRs provide insights into the co-evolution of host and viral genomes. *PLoS One* **4**:e4169.
- Hernández-Lucas, I., et al. 2008. The LysR-type transcriptional regulator LeuO controls the expression of several genes in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J. Bacteriol.* **190**:1658–1670.
- Hommais, F., et al. 2001. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol. Microbiol.* **40**:20–36.
- Horvath, P., and R. Barrangou. 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* **327**:167–170.
- Jansen, R., J. D. van Embden, W. Gastra, and L. M. Schouls. 2002. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. *OMICS* **6**:23–33.
- Jansen, R., J. D. van Embden, W. Gastra, and L. M. Schouls. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **43**:1565–1575.
- Kaminuma, E., et al. 9 November 2010. DDBJ progress report. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkq1041.
- Karginov, F. V., and G. J. Hannon. 2010. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol. Cell* **37**:7–19.
- Kawaji, H., T. Mizuno, and S. Mizushima. 1979. Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins O-8 and O-9 of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **140**:843–847.
- Kazakov, A. E., et al. 2007. RegTransBase—a database of regulatory sequences and interactions in a wide range of prokaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* **35**:D407–D412.
- Labrie, S. J., J. E. Samson, and S. Moineau. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:317–327.
- Lillestøl, R. K., et al. 2009. CRISPR families of the crenarchaeal genus *Sulfolobus*: bidirectional transcription and dynamic properties. *Mol. Microbiol.* **72**:259–272.
- Lucchini, S., et al. 2006. H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog.* **2**:e81.
- Madhusudan, S., A. Paukner, Y. Klingen, and K. Schnetz. 2005. Independent regulation of H-NS-mediated silencing of the *bgl* operon at two levels: upstream by BglJ and LeuO and downstream by DnaKJ. *Microbiology* **151**:3349–3359.
- Makarova, K. S., N. V. Grishin, S. A. Shabalina, Y. I. Wolf, and E. V. Koonin. 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* **1**:7.
- Marraffini, L. A., and E. J. Sontheimer. 2008. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* **322**:1843–1845.
- Marraffini, L. A., and E. J. Sontheimer. 2010. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature* **463**:568–571.
- Marraffini, L. A., and E. J. Sontheimer. 2010. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Genet.* **11**:181–190.
- Marshall, D. G., B. J. Sheehan, and C. J. Dorman. 1999. A role for the leucine-responsive regulatory protein and integration host factor in the regulation of the *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) locus in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **34**:134–145.
- Martínez-Laguna, Y., E. Calva, and J. L. Puente. 1999. Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **33**:153–166.
- Mayer, M. P. 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**:41–46.
- Mendoza-Vargas, A., et al. 2009. Genome-wide identification of transcription start sites, promoters and transcription factor binding sites in *E. coli*. *PLoS One* **4**:e7526.
- Mojica, F. J., C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez, and E. Soria. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* **60**:174–182.
- O'Byrne, C. P., and C. D. Dorman. 1994. Transcription of the *Salmonella typhimurium* *spv* virulence locus is regulated negatively by the nucleoid-associated protein H-NS. *FEMS Microbiol. Lett.* **12**:99–106.
- Pourcel, C., G. Salvignol, and G. Vergnaud. 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* **151**:653–663.
- Puente, J. L., V. Flores, M. Fernández, Y. Fuchs, and E. Calva. 1987. Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene* **61**:75–83.
- Pul, U., et al. 2005. LRP and H-NS cooperative partners for transcription regulation at *Escherichia coli* rRNA promoters. *Mol. Microbiol.* **258**:864–876.
- Pul, U., R. Wurm, and R. Wagner. 2007. The role of LRP and H-NS in transcription regulation: involvement of synergism, allostery and macromolecular crowding. *J. Mol. Biol.* **366**:900–915.
- Pul, U., et al. 2010. Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-*cas* promoters and their silencing by H-NS. *Mol. Microbiol.* **7**:1495–1512.
- Robison, K., A. M. McGuire, and G. M. Church. 1998. A comprehensive library of DNA-binding site matrices for 55 proteins applied to the complete *Escherichia coli* K-12 genome. *J. Mol. Biol.* **284**:241–254.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Shimada, T., K. Yamamoto, and A. Ishihama. 2009. Involvement of the

- leucine response transcription factor LeuO in regulation of the genes for sulfa drug efflux. *J. Bacteriol.* **191**:4562–4571.
59. **Stratmann, T., S. Madhusudan, and K. Schnetz.** 2008. Regulation of the *yjyQ-bglJ* operon, encoding LuxR-type transcription factors, and the divergent *yjyP* gene by H-NS and LeuO. *J. Bacteriol.* **190**:926–935.
60. **Ueguchi, C., T. Ohta, C. Seto, T. Suzuki, and T. Mizuno.** 1998. The *leuO* gene product has a latent ability to relieve *bgl* silencing in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**:190–193.
61. **van der Oost, J., M. M. Jore, E. R. Westra, M. Lundgren, and S. J. Brouns.** 2009. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **34**:401–407.
62. **van Helden, J., B. André, and J. Collado-Vides.** 1998. Extracting regulatory sites from the upstream region of yeast genes by computational analysis of oligonucleotide frequencies. *J. Mol. Biol.* **281**:827–842.
63. **Viswanathan, P., K. Murphy, B. Julien, A. G. Garza, and L. Kroos.** 2007. Regulation of *dev*, an operon that includes genes essential for *Myxococcus xanthus* development and CRISPR-associated genes and repeats. *J. Bacteriol.* **189**:3738–3750.
64. **Westra, E. R., et al.** 2010. H-NS mediated repression of CRISPR-based immunity in *Escherichia coli* K12 can be relieved by the transcription activator LeuO. *Mol. Microbiol.* **77**:1380–1393.
65. **Zegans, M. E., et al.** 2009. Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **191**:210–219.

10. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en este estudio demuestran la existencia de diferencias relevantes en la regulación transcripcional del sistema CRISPR/Cas, entre dos especies filogenéticamente cercanas: *E. coli* y *Salmonella*. En *Salmonella* se detectaron dos unidades transcripcionales: el operón CRISPR-Cas dependiente de LeuO y una unidad transcripcional la cual incluye *casB* y es independiente de LeuO. Esto contrasta con los resultados obtenidos en *E. coli* K-12, donde se han determinado dos unidades transcripcionales: una conformada por *casABCDE12* y la otra por las secuencias CRISPR (Shimada *et al.*, 2009; Pul *et al.*, 2010). La participación de la Proteína reguladora de respuesta a leucina (LRP) no se ha observado en el ortólogo presente en *E. coli* K-12 (Pul *et al.*, 2010). Los datos mencionados indican que el cluster CRISPR/Cas no responde a las mismas señales ambientales. Por lo tanto, la regulación y la organización transcripcional del sistema podrían depender del procarionte hospedero y de su ciclo de vida.

En este trabajo, también se determinó que el sistema CRISPR/Cas se induce en medio mínimo N, el cual simula el ambiente que enfrenta *Salmonella* dentro de la célula eucarionte (Deiwick *et al.*, 1999). Lo anterior sugiere que en *S. enterica* Typhi el cluster CRISPR/Cas podría tener una función en virulencia, además del papel en la defensa contra la invasión de material genético exógeno. De manera interesante, existen otras evidencias que sugieren la posibilidad de que el locus CRISPR/Cas en enterobacterias no funcione únicamente como un sistema inmune bacteriano. Por ejemplo, análisis bioinformáticos realizados en *Escherichia coli* y *Salmonella* revelan poca variabilidad en los espaciadores de los CRISPR entre cepas con 250,000 años de divergencia. Además, éstas secuencias no tienen homología con fagos de enterobacterias (Touchon y Rocha, 2010). Adicionalmente, no se detectó expresión de los componentes del programa CRISPR/Cas durante la infección de *E. coli* por el bacteriófago PRD1 (Poranen *et al.*, 2006). Caso opuesto a *Thermus thermophilus*, donde se observa expresión de diferentes proteínas Cas y las secuencias CRISPR después de la invasión por el fago Φ YS40 (Agari *et al.*, 2010). Por lo tanto, en enterobacterias el sistema no es

tan dinámico como en arqueas. Lo anterior pone en duda el papel del sistema CRISPR/Cas en la defensa contra DNA invasor en ésta familia de microorganismos. Adicionalmente, en diversos microorganismos se ha demostrado la participación CRISPR/Cas en otras funciones celulares fundamentales. Por ejemplo, en *E. coli* K-12, cepas mutantes en *cas1* muestran deficiencia en la reparación de DNA dañado y en la segregación del cromosoma, comparadas con la cepa silvestre (Babu *et al.*, 2011). En patógenos como *Campylobacter jejuni* la delección de la proteína Cas Csn1 disminuye la citotoxicidad y la capacidad de invadir células epiteliales, debido a la alteración en la producción de flagelo (Louwen *et al.*, CRISPR meeting 2010). En *S. pyogenes*, CRISPR controla la patogénesis, al albergar espaciadores con homología a profagos, los cuales contienen diversos factores de virulencia (Chylinski *et al.*, CRISPR meeting 2010). Finalmente, el conjunto CRISPR/Cas se expresa en condiciones de estrés como radiación UV y alta fuerza iónica en *Thermoproteus tenax* (Plagens *et al.*, CRISPR meeting 2010).

Por otra parte, es inevitable mencionar las similitudes entre el mecanismo CRISPR/Cas presente en bacterias y la interferencia por RNA en eucariontes. En ambos sistemas se procesa un precursor de RNA para generar pequeños ácidos ribonucleicos indispensables para la interferencia. Las proteínas responsables de este evento corresponden a la nucleasa Dicer en eucariontes (Bagasra y Prilliman, 2004) y a diferentes nucleasas en procariontes (CasE, Cas6, Cys4, RNAsaIII) (Brouns *et al.*, 2008; Carte *et al.*, 2008; Haurwitz *et al.*, 2010; Deltcheva *et al.*, 2011). Otra similitud radica en el ensamble de los sRNAs a un complejo enzimático para dirigirlo hacia el material genético invasor, el cual es degradado por Slicer en el sistema eucariótico (Bagasra y Prilliman, 2004) o Cas3 en bacterias (Sinkunas *et al.*, 2011). Aunque ambos sistemas contienen proteínas con las mismas funciones, éstas no son ortólogas entre sí (Makarova *et al.*, 2006). Por otra parte, el sistema CRISPR/Cas es capaz de degradar DNA o RNA mientras el programa eucariótico solo reconoce RNA mensajero, el cual puede ser degradado o no traducido. Una diferencia relevante entre el RNAi y el mecanismo CRISPR/Cas es la capacidad del sistema bacteriano de generar memoria al

incorporar pequeñas regiones del DNA invasor, los cuales generarán inmunidad específica para futuras reinfecciones.

Los fagos son los principales depredadores procariótico, estos organismos son responsables del 4-50% de la destrucción global bacteriana por día (Karginov y Hannon, 2010). Debido a lo anterior, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de defensa para evitar su extinción, es necesario continuar estudiando las estrategias genéticas moleculares presentes en procariontes, las cuales sin duda seguirán evolucionado con el objetivo de asegurar la sobrevivencia procariótica.

11. CONCLUSIONES

El análisis transcripcional de los genes *casA-casB-casC-casD-casE-cas1-cas2* y de las secuencias CRISPR revela que este locus constituye un operón dependiente del regulador LeuO. Ésta proteína interacciona en dos zonas de la región intergénica 5' de *casA* promoviendo activación. En este trabajo también se determinó el papel de H-NS y LRP en la regulación negativa de *casA*. Ambas proteínas se unen río arriba y río abajo respecto al inicio de transcripción, específicamente en los nucleótidos -375 a -50 y de +49 a +191. Adicionalmente, se determinó la expresión de *casA*, en medio mínimo N, el cual contiene concentraciones limitadas de Mg^{2+} y Fe^{2+} . De manera interesante, la actividad detectada es independiente de LeuO. Este estudio demuestra la existencia de diferentes señales y múltiples reguladores transcripcionales globales involucrados en el control del grupo CRISPR/Cas en *Salmonella enterica* serovar Typhi. Lo anterior sugiere la participación en otra(s) función(es) diferente(s) a la interferencia de DNA extraño por parte del sistema CRISPR/Cas en *S. enterica* Typhi e indica que la funcionalidad de este conjunto genético podría depender del microorganismo hospedero.

12. PERSPECTIVAS

En este proyecto de investigación se ha determinado el papel funcional de los reguladores globales LeuO, H-NS y Lrp en la regulación transcripcional del sistema CRISPR/Cas de *Salmonella enterica* serovar Typhi. Sin embargo, es necesario determinar los nucleótidos involucrados en la represión mediada por H-NS y LRP. Adicionalmente, es relevante determinar si existen otros elementos genéticos en los cuales LRP reprima únicamente en ausencia de H-NS. Esto indicaría la existencia de otros reguladores globales, en adición a StpA, capaces de intervenir en el silenciamiento del regulón H-NS.

El aminoácido leucina puede influir en la actividad de la proteína asociada al nucleóide LRP. Por lo tanto, es relevante determinar si este aminoácido, a través de LRP, está involucrado en la inactivación del cluster CRISPR/Cas en *Salmonella*. Esto sin duda contribuirá a conocer las señales implicadas en la expresión de este sistema inmune. Por otra parte, el regulador tipo LysR, LeuO, responde a la concentración de leucina presente en el medio. Debido a lo anterior es fundamental explorar si existe alguna relación funcional entre LRP y LeuO, la cual influiría en el control genético del locus CRISPR/Cas de *S. enterica* Typhi.

Respecto a la regulación positiva, se determinó que la sobreexpresión de la proteína LeuO induce moderadamente la actividad del sistema CRISPR/Cas en *S. enterica* Typhi. No obstante, dicho regulador no funge como el activador principal del cluster en medio rico ni en medio mínimo N. Por lo tanto, se deben identificar los reguladores transcripcionales implicados en la activación del cluster CRISPR/Cas con la finalidad de conocer la red de regulación global involucrada en la expresión genética de este conjunto genético.

Los resultados de este trabajo sugieren la presencia de múltiples unidades transcripcionales en el cluster CRISPR/Cas. Es de vital importancia determinar la longitud de estas y relacionarlas con la función de los genes transcritos para poder establecer una función en *Salmonella enterica* serovar Typhi.

Finalmente, consideramos esencial realizar ensayos de infección en macrófagos de humanos con la cepa silvestre y cepas carentes del sistema CRISPR/Cas con el fin de evaluar el papel de dicho cluster en la interacción *Salmonella*-célula eucarionte. Estos experimentos se basan en la activación de *casA* bajo condiciones utilizadas para la inducción de la isla de patogenicidad 2 (medio mínimo N), necesaria para la sobrevivencia de *Salmonella* dentro de la célula eucariótica, sugiriendo un papel de CRISPR/Cas en virulencia. Adicionalmente, es esencial descartar la funcionalidad de este sistema en la resistencia a fagos, en *S. enterica* Typhi.

El estudio global del conjunto CRISPR/Cas en *Salmonella*, sin duda generará información relevante sobre el funcionamiento de éste sistema inmune bacteriano.

13. MATERIALES Y MÉTODOS

13.1 Cepas bacterianas utilizadas en este estudio

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	$F^{-}ompT\ gal\ (dcm)\ (lon)\ hsdS_B(r_B^{-}\ m_B^{-})\ met(DE3)$.	Novagen
DH5 α	$\Phi80d/lacZ\Delta M15\ \Delta(lacZYA-argF)\ U169\ recA1\ endA1\ hsdR17\ (r_k^{-}\ m_k^{+})\ phoA\ supE44\ \lambda\text{-}thi\text{-}1\ gyrA96\ relA!\ NaI^R$.	Gibco BRL
<i>S. enterica</i> Typhi IMSS-1	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi 9.12, d, serotipo Vi. Aislado clínico mexicano.	Puente <i>et al.</i> , 1987.
IMSS-1 $\Delta(casA\text{-}CRISPR)$	IMSS-1 $\Delta(casA\text{-}CRISPR)::Km^R$	Este estudio.
IMSS-1 ΔIrp	IMSS-1 $\Delta Irp::Km^R$	Este estudio.
IMSS-1 $\Delta Irp/hns$	IMSS-1 $\Delta Irp, hns99::Km^R$	Este estudio.
IMSS-32	IMSS-1 $\Delta leuO$ con el plásmido pFMTrc12 Ap ^R	Hernández-Lucas <i>et al.</i> , 2008.
IMSS-33	IMSS-1 $\Delta leuO$ con el plásmido pFMTrcleuO-50 Ap ^R	Este estudio.
IMSS-II	IMSS-I con el plásmido pFMTrc12	Fernández-Mora <i>et al.</i> , 2004.
IMSS-III	IMSS-1 con el plásmido pFMTrcleuO-50	De la Cruz <i>et al.</i> , 2007.
STYhns99	IMSS-I $hns99::Km^R\ mariner$	Flores-Valdez <i>et al.</i> , 2003.

13.2 Plásmidos utilizados en este estudio

Plásmido	Descripción	Referencia
pFMTrc12	Derivado del pTrc99A con un origen de replicación p15A1, Ap ^R .	Fernández-Mora, <i>et al.</i> , 2004.
pFMTrcleuO-50	Derivado del pFMTrc12 conteniendo el gen <i>leuO</i> de <i>S. enterica</i> Typhi bajo un promotor inducible por IPTG P _{trc} , Ap ^R .	Fernández-Mora, <i>et al.</i> , 2004.
pKD4	Derivado de pANTS _γ conteniendo secuencias FRT adyacentes al gen de resistencia a Kanamicina; Km ^R .	Datsenko y Wanner, 2000.
pKD46	Sistema de recombinasa λ Red bajo el promotor inducible por arabinosa, Ap ^R .	Datsenko y Wanner, 2000.
pKK232-8	Derivado del pBR322 con el gen cloranfenicol acetiltransferasa (<i>cat</i>) sin promotor, Ap ^R .	Pharmacia LKB Biotechnology
pKK232-9	Derivado del pKK232-8, con el gen de Kanamicina obtenido del pUC4K, clonado PstI, Km ^R .	Hernández-Lucas <i>et al.</i> , 2008.
pKK-375	Derivado del pKK232-8, con la región promotora de <i>casA</i> albergando 375 pb corriente arriba y 191 pb corriente abajo del inicio de transcripción de <i>casA</i> , clonado BamHI- KpnI; Ap ^R .	Este trabajo
pKK-231	Derivado del pKK232-8, con la región promotora de <i>casA</i> , incluye 231 pb corriente arriba y 191 pb corriente abajo respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , clonado BamHI- KpnI, Ap ^R .	Este trabajo
pKK-158	Derivado del pKK232-8, con la región promotora de <i>casA</i> , incluye 158 pb corriente arriba y 191 pb corriente abajo respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , clonado BamHI- KpnI, Ap ^R .	Este trabajo
pKK-111	Derivado del pKK232-8, con la región promotora de <i>casA</i> , incluye 111 pb corriente arriba y 191 pb corriente abajo respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , clonado BamHI- KpnI, Ap ^R .	Este trabajo

pKK-91	Derivado del pKK232-8, con la región promotora de <i>casA</i> , incluye 91 pb corriente arriba y 191 pb corriente abajo respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , clonado <i>Bam</i> HI- <i>Kpn</i> I, Ap ^R .	Este trabajo
pKK-73	Derivado del pKK232-8, con la región promotora de <i>casA</i> , incluye 73 pb corriente arriba y 191 pb corriente abajo respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , clonado <i>Bam</i> HI- <i>Kpn</i> I, Ap ^R .	Este trabajo
pKK-51	Derivado del pKK232-8, con la región promotora de <i>casA</i> , incluye 51 pb corriente arriba y 191 pb corriente abajo respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , clonado <i>Bam</i> HI- <i>Kpn</i> I, Ap ^R .	Este trabajo
pKK-51/+99	Derivado del pKK232-8, con la región promotora de <i>casA</i> , incluye 51 pb corriente arriba y 99 pb corriente abajo respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , clonado <i>Bam</i> HI- <i>Kpn</i> I, Ap ^R .	Este trabajo
pKK-51/+49	Derivado del pKK232-8, con la región promotora de <i>casA</i> , incluye 51 pb corriente arriba y 49 pb corriente abajo respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , clonado <i>Bam</i> HI- <i>Kpn</i> I, Ap ^R .	Este trabajo
pKK-51/+11	Derivado del pKK232-8, con la región promotora de <i>casA</i> , incluye 51 pb corriente arriba y 11 pb corriente abajo respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , clonado <i>Bam</i> HI- <i>Kpn</i> I, Ap ^R .	Este trabajo
pKK9- <i>casA</i>	Derivado del pKK232-9, con la región promotora de <i>casA</i> , incluye 375 pb corriente arriba y 191 pb corriente abajo respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , clonado <i>Bam</i> HI- <i>Kpn</i> I, Km ^R .	Este trabajo
pKK9- <i>casA</i> (-10 ATA→GGG)	Derivado del pKK9- <i>casA</i> , con una sustitución (ATA→GGG) en los nucleótidos -9 a -11 respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , Km ^R .	Este trabajo
pKK9 <i>casA</i> -A	Derivado del pKK9- <i>casA</i> , con una sustitución (TTT→CCC) en los nucleótidos -115 a -117 respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , Km ^R .	Este trabajo

pKK9 <i>casA</i> -B	Derivado del pKK9- <i>casA</i> , con una sustitución (TTTT→CCCC) en los nucleótidos -114 a -117 respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , Km ^R .	Este trabajo
pKK9 <i>casA</i> -C	Derivado del pKK9- <i>casA</i> , con una sustitución (TAT→CGC) en los nucleótidos -103 a -105 respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , Km ^R .	Este trabajo
pKK9 <i>casA</i> -D	Derivado del pKK9- <i>casA</i> , con una sustitución (ATA→GCG) en los nucleótidos -88 a -90 respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , Km ^R .	Este trabajo
pKK9 <i>casA</i> -E	Derivado del pKK9- <i>casA</i> , con una sustitución (AAA→GGG) en los nucleótidos -77 a -79 respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , Km ^R .	Este trabajo
pKK9 <i>casA</i> -F	Derivado del pKK9- <i>casA</i> , con una sustitución (TAA→CGG) en los nucleótidos -60 a -62 respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , Km ^R .	Este trabajo
pKK9-CRISPR	Derivado del pKK232-9 albergando de la base +64 a +788 respecto al inicio de traducción de <i>cas2</i> , clonado <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I, Km ^R .	Este trabajo
pKK9-RR- <i>casA</i> -CRISPR	Derivado del pKK232-9 conteniendo 347 pb corriente arriba y 6382 pb corriente abajo del inicio de traducción de <i>casA</i> , clonado <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I, Km ^R .	Este trabajo
pKK9-RR- <i>casA</i> - <i>cas2</i>	Derivado del pKK232-9 conteniendo 347 pb corriente arriba y 5808 pb corriente abajo del inicio de traducción de <i>casA</i> , clonado <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I, Km ^R .	Este trabajo
pKK9-ΔRR- <i>casA</i> - <i>cas2</i>	Derivado del pKK232-9 conteniendo 56 pb corriente arriba y 5808 pb corriente abajo del inicio de traducción de <i>casA</i> , clonado <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I, Km ^R .	Este trabajo
pMDH-NS	pBAD- <i>Myc</i> -His ₆ albergando el gen <i>hns</i> de <i>S. enterica</i> Typhi fusionado a <i>Myc</i> -His ₆ bajo un promotor inducible por arabinosa, Tc ^R .	De la Cruz <i>et al.</i> , 2007.

pT6-LRP-His ₆	pMPM-T6Ω albergando el gen <i>lrp</i> de <i>S. enterica</i> Typhi fusionado a His ₆ bajo un promotor inducible por arabinosa, Tc ^R .	Este trabajo
--------------------------	--	--------------

13.3 Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')
16S-F	GCCCAGATGGGATTAGCTAAGT
16S-R	CGGTTATTAACCAACACC
<i>cas2</i> -R	CCGCTCGAGCGGCTGAAACTCAAACCTGATTCTGTA
<i>casA</i> 5'RACE	ATCCAGAAGATCGCGTAATGA
<i>casA</i> -375F	CGGGATCCTGGTACTGGAAATCCAGC
<i>casA</i> -347F	CGGGATCCTAGGAGGGGATTACAATGAAATC
<i>casA</i> -231F	CGGGATCCGATAATAAATTGGGATACGGG
<i>casA</i> -158F	CGGGATCCACGCTGCGCTATTAAGACTG
<i>casA</i> -111F	CGGGATCCGGAACGTATTAAGATAACAG
<i>casA</i> -91F	CGGGATCCGATAACTATAAAAAATACATAGTC
<i>casA</i> -73F	CGGGATCCATAG TCTGATTTAAGACTG
<i>casA</i> -52R	ATACAGTCTTAAATCAGACTATGTATTTTTATAGTTATCTGTTA
<i>casA</i> -51F	CGGGATCCCTACTTTTTATTTATTTTTCG
<i>casA</i> -10F	CGTCTTCGAGAAAATGTAGTGGGACTCCGATGACAGTATTTAAG
<i>casA</i> -10R	CTTAAATACTGTCATCGGAGTCCCACTACATTTTCTCGAAGACG
<i>casA</i> +191R	GGGGTACCTCCTGAATGCGGTTATCCAG
<i>casA</i> +99R	GGGGTACCATCCATACCTTTACTCCTGC
<i>casA</i> +56F	CGGGATCCTATAGGTAGGTAATATTCCAAATTG
<i>casA</i> +50F	ATATTCCAAATTGGCTTAATAAATAGCCCTGCAGGAGTA AAGGT
<i>casA</i> +49R	GGGGTACCTACCTACCTATAGGTAGATTCC
<i>casA</i> +11F	GATCCCTACTTTTTATTTATTTTTCGTCTTCGAGAAAATGTAGTATAACT CCGATGACAGTATTTAGGTAC
<i>casA</i> +11R	CTAAATACTGTCATCGGAGTTATACTACATTTTCTCGAAGACGAAAATAT AAATAAAAAGTAGG
<i>casA</i> -AB-F	CGGTTTATCCATAACCCTAGGGAACGTATTAAG
<i>casA</i> -AB-R	CTTTAATACGTTCCCTAGGGTTATGGGATAAACCG

<i>casA-C-F</i>	CCCATAATTTTAGGGAACGCGCTAAAGATAACAG
<i>casA-C-R</i>	CTGTTATCTTTAGCGCGTTCCCTAAAATTATGGG
<i>casA-D-F</i>	CGTATTAAAGATAACAGGGCGACTATAAAAAATAC
<i>casA-D-R</i>	GTATTTTTTATAGTCGCCTGTTATCTTTAATACG
<i>casA-E-F</i>	CAGATAACTATAAAGGGTACATAGTCTGATTTAAG
<i>casA-E-R</i>	CTTAAATCAGACTATGTACCCTTTATAGTTATCTG
<i>casA-F-F</i>	CATAGTCTGATTCGGGACTGTATCTAC
<i>casA-F-R</i>	GTAGATACAGTCCCGAATCAGACTATG
<i>casC-F</i>	CGGGATCCGAATTGAAGAAAAATTGCTAAGAG
<i>casC-R</i>	CCGCTCGAGCGGTTAATCAAATAATTTTCATGGTTAC
CRISPR-F	CGGGATCCTGGTACTGGAAATTCGAGC
CRISPR-R	CCGCTCGAGCGGAACGTCCTGATATGCTGGTGAAAC
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC
<i>Irp-F</i>	TACAGAGAGACAATAATAATGGTAGATAGCAAGAAGCGCCCTTGTAGG CTGGAGCTGCTTCG
<i>Irp-R</i>	TTTTGCACCTGTTCCGTGGTTAGCGTGTCTTAATAACCAGACGCATATG AATATCCTCCTTAG

13.4 Construcción de fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*

Se amplificó DNA de diferentes longitudes de la región promotora de *casA* utilizando la enzima *Pfu Turbo*[®] DNA polymerase (Stratagene) con el programa que se muestra a continuación:

95°C	5 min	} 30 ciclos
95°C	1:30 min	
55°C	1:30 min	
72°C	1:30 min	
72°C	10 min	

Los fragmentos de DNA se ligaron al plásmido pKK232-9 o pKK232-8 y se transformaron por choque térmico en células de *E. coli* DH5 α , seleccionándose las clonas por la resistencia al antibiótico correspondiente.

Los plásmidos se purificaron con el kit High Pure Plasmid Isolation (Roche Applied Science) siguiendo el protocolo correspondiente y cada uno fue transformado en las cepas IMSS-1 con el plásmido pFMTrc12 e IMSS-1 conteniendo el pFMTrcleuO-50 para realizar cinéticas de expresión y determinar la actividad específica de CAT.

13.5 Mutagénesis sitio dirigida

Las sustituciones en los sitios de pegado de LeuO y en la caja -10 de la región promotora de *casA* se llevaron a cabo con el kit de Stratagene (QuickChange®XL Site-Directed Mutagenesis Kit).

Se realizaron PCR con primers complementarios que tuvieran la sustitución deseada y usando como templado el plásmido pKK9-*casA*. Las condiciones con las que se llevó a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) son:

95°C	3 min		
95°C	3 min	}	18 ciclos
50°C	3 min		
68°C	10 min		
68°C	10 min		

Las reacciones de PCR fueron digeridas con 2 µl de enzima *Dpn I*, para eliminar el ADN utilizado como templado, posteriormente, los plásmidos sintetizados *in vitro* se transformaron en la cepa DH5α, las clonas se seleccionaron por resistencia al antibiótico correspondiente y perfiles de plásmido tipo Eckhardt fueron realizados para seleccionar las clonas con el vector correcto, los plásmidos fueron purificados con High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science) y las mutaciones fueron confirmadas mediante secuenciación, realizadas en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología (UNAM).

Los vectores con la mutación correcta fueron transformados en *Salmonella enterica* serovar Typhi conteniendo pFMTrc12 y en *S. enterica* Typhi con pFMTrcleuO50, para realizar los ensayos de actividad de CAT correspondientes.

13.6 Ensayos de actividad específica de CAT en medio nutritivo

Las diferentes cepas fueron inoculadas por duplicado en 100 ml de medio nutritivo MA (7 g de caldo nutritivo, 1 g de extracto de levadura, 2 ml de glicerol, 3.7 g de K₂HPO₄ y 1.3 g de KH₂PO₄, aforado a un litro con agua MiliQ) con o sin 50 μM de IPTG, según corresponda, incubadas a 37 °C (200 rpm) y en condiciones aeróbicas. Se tomaron 1.5 ml de los cultivos de una OD₍₅₉₅₎ de 0.4, 0.6 y 0.8, 1 ml de OD₍₅₉₅₎ de 1 y 0.5 ml de las 12 h de crecimiento (OD₍₅₉₅₎ 1.1 - 1.4). Las muestras se centrifugaron y lavaron con TDTT resuspendiéndolas en 0.6 ml de éste último y fueron sonicadas 3 min (9.9 s ON - 9.9 s OFF).

Con el sobrenadante se realizó la determinación de proteínas totales y actividad de CAT. Las proteínas totales se determinaron por el método espectrofotométrico utilizando el BCA Protein Assay Kit Reagent (Pierce). Las proteínas de la muestra reducen el Cu²⁺ que interacciona con el BCA (Ácido bicinconínico) formando un compuesto coloreado detectable a 562 nm.

La actividad de CAT también se realizó espectrofotométricamente utilizando acetil-coenzima A (acetil-CoA), cloranfenicol y ácido 5,5'- ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). CAT transfiere el grupo acetilo de la acetil-CoA al cloranfenicol, inactivándolo y el CoA reducido reacciona con el DNTB produciendo CoA disulfido, ácido trinitrobenzoico y tionitrobenzoico libre, compuesto que absorbe a 412 nm. Una unidad de CAT equivale a 1 μmol de cloranfenicol acetilado por minuto.

Finalmente, la actividad específica del reportero *cat*, se obtuvo a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Pr o medio CAT}}{[\text{P roteinas}]} (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg de proteína})$$

13.7 Ensayos de actividad específica de CAT en medio mínimo

Tres mililitros de un cultivo de toda la noche de las cepas a evaluar, fueron centrifugados, lavados y resuspendidos para inocular 50 ml de medio mínimo MM-N (5 mM de KCl, 7.5 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 mM de K_2SO_4 , 1 mM de KH_2PO_4 , 100 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 200 μM de MgCl_2 , 0.5% de glicerol y 0.1% de casa aminoácidos), los cultivos se incubaron a 37 °C (200 rpm) y en condiciones aeróbicas por 16 h. Se tomaron 0.5 ml de las muestras, lavándolas con TDTT y resuspendiendo en 0.6 ml del mismo. La sonicación se llevó a cabo por 3 minutos (9.9 s ON – 9.9 s OFF).

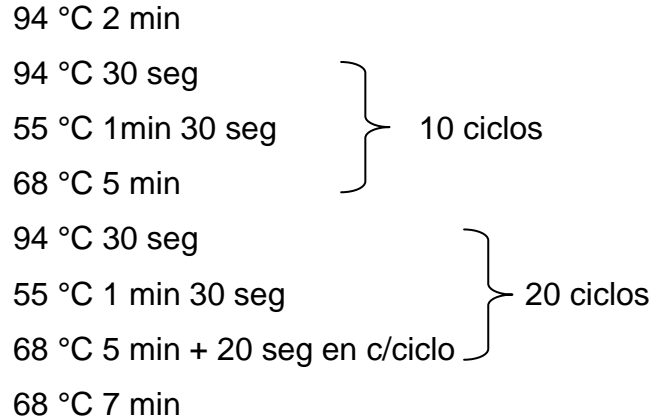
Para la determinación de proteínas y actividad de CAT se siguió el mismo procedimiento que en el apartado anterior.

13.8 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

Las cepas IMSS-1 pFM*Trc12* e IMSS-1 pFM*TrcleuO-50* fueron inoculadas en 100 ml de medio MA a 37 °C (200 rpm) en condiciones aeróbicas. Posteriormente, 1.5 ml a una $\text{OD}_{(595)}$ de 0.6 fueron colectados y el RNA total fue extraído con el método de fenol ácido. A continuación, los transcritos fueron purificados con el Kit RNeasy (Qiagen).

El RNA purificado se resuspendió en agua DEPC y fue cuantificado espectrofotométricamente (260 nm). 8 μg de cada RNA fueron digeridos con 2 μl de DNasa I, RNasa-free (Fermentans) siguiendo las indicaciones recomendadas por el fabricante. Se realizaron PCRs de *cas2* y rRNA 16S utilizando RNA como molde para corroborar la ausencia de DNA.

Para sintetizar el cDNA se utilizó el Kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentans), 1 μg de RNA y un oligonucleótido para las secuencias CRISPR. La reacción se llevó a cabo a 42 °C por 60 min. El cDNA y oligonucleótidos específicos fueron utilizados para amplificar los fragmentos *casA-casC* y *casC-cas2*, bajo las siguientes condiciones:



30 µl de cada producto de PCR fueron colocados en un gel de agarosa 0.8%/TAE 0.5X. La electroforesis se realizó a 130 volts por 1 h 20 min, finalmente los fragmentos de DNA se observaron con bromuro de etidio.

13.9 Northern Blot

Las cepas IMSS-1/pFM*Trc12*, IMSS-1/pFM*TrcleuO-50* e IMSS-1 Δ (*casA*-CRISPR) fueron inoculadas en 100 ml de medio rico MA a 37 °C. A las 12 h de crecimiento se colectaron 10 ml de cada cultivo para realizar la extracción de RNA total utilizando el método de fenol ácido. Los RNAs obtenidos se separaron por electroforesis en un gel desnaturizante de agarosa (formaldehído 16%, MOPS 1X). Para determinar los pesos moleculares se colocó un marcador de RNA (0.24 kb–9.5 kb; Invitrogen). Posteriormente, los RNAs fueron transferidos a una membrana de nylon (GE Healthcare). La transferencia se realizó por 24 h con buffer alcalino (0.01 N de NaOH y 3 M de NaCl).

Las membranas fueron prehibridadas e hibridadas a 65 °C con buffer Rapid Hyb durante 12 h (GE Healthcare). Al término de la hibridación, se lavaron con SSC 2X/SDS 0.1% por 15 min, SSC 1X/SDS 0.1% por 15 min, SSC 0.5X/SDS 0.1% por 15 min y finalmente con SSC 0.1X/SDS 0.1% por 30 min. Finalmente, las membranas fueron incubadas durante 48 h con una película Kodak X-Omat LS. Las sondas se marcaron con radioactividad utilizando el kit Rediprime y el isótopo α -³²P dCTP.

13.10 Generación de mutantes por recombinación homóloga

Para generar las mutantes en los genes *lrp* y *hns*, se utilizó el método descrito por Datsenko y Wanner (2000). De manera breve, la cepa *S. enterica* Typhi IMSS-1 silvestre se transformó con el plásmido termosensible pKD46 (Ap^R), el cual contiene el sistema de recombinasa Red. La bacteria se creció a 30 °C y se seleccionaron aquellas colonias resistentes a ampicilina.

Posteriormente, se realizaron PCRs utilizando como molde el plásmido pKD4 que contiene las secuencias FRT adyacentes al gen de resistencia a Kanamicina (Km) y oligos correspondientes al gen que se desea inactivar. Los primers contenían la secuencia del gen de Km y del ORF de interés. Los productos de PCR fueron transformados en la cepa IMSS-1 albergando el plásmido pKD46. Las transformaciones se sembraron en agar LB con Km incubándose a 37 °C. Posteriormente, las colonias obtenidas se estiraron en LB-Km y LB-Ap y se seleccionaron aquellas colonias resistentes a Km y sensibles a Ap, indicando la ausencia del plásmido pKD46 y la presencia del interposón de Km.

El DNA genómico de las mutantes fue amplificado y secuenciado con el objetivo de corroborar la eliminación deseada.

13.11 Purificación de H-NS y LRP

100 ml de medio LB (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g of NaCl por litro) fueron incubados con las cepas *E. coli* BL21 conteniendo el plásmido pMDH-NS o con *E. coli* BL21 albergando el pT6-LRP-His₆. Las bacterias se incubaron a 37 °C (200 rpm) hasta alcanzar una OD₅₉₅ de 0.4. Posteriormente, la expresión se indujo durante 4 h con 0.1% de L-arabinosa.

Los cultivos (100 ml) se centrifugaron a 8,000 rpm durante 5 min (4 °C), las células fueron resuspendidas en 5 ml de buffer de unión (8 M urea, 100 mM

NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) y sonicadas. Los restos celulares fueron eliminados centrifugando 5 minutos a 12,000 rpm. Los lisados obtenidos se colocaron en una columna de Níquel Ni-NTA Agarose (Quiagen). Posteriormente, se realizaron diez lavados con un buffer de urea 8 M pH 6.5. Finalmente las muestras se eluyeron en urea 8 M pH 4.5.

Utilizando un gel SDS-PAGE se seleccionaron las fracciones que contenían H-NS-Myc-His6 o LRP-His6. Las fracciones seleccionadas fueron dializadas en un casete Slyde-A-Lyzer10K (Pierce) a 4 °C con el buffer de diálisis, el cual contiene, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 20% glicerol, 500 mM NaCl, 0.1% Tritón X-100 y 4 M de urea durante 2 h. El mismo buffer conteniendo diferentes concentraciones de urea (1 M y 0.2 M) fue utilizado, posteriormente, durante 2 h. Finalmente, las muestras fueron incubadas en un amortiguador el cual contiene 30 mM de Tris-HCl pH 8.0, 10 mM de MgCl₂, 20% de glicerol, 500 mM de NaCl, 0.1% de Tritón X-100 y 3 mM de EDTA. La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford.

13.12 Ensayos de retardamiento en gel

13.12.1 EMSAs con H-NS

Mediante PCR se amplificaron diferentes fragmentos de la región intergénica 5' de *casA* para realizar ensayos de retardo con la proteína H-NS Myc-His. 100 ng de DNA se incubaron con concentraciones crecientes de la proteína H-NS en presencia de buffer de unión 10X (400 mM de HEPES, 80 mM de MgCl₂, 500 mM de KCl, 10 mM de DTT, 0.5% de NP40 y 1 mg ml⁻¹ de BSA). Las mezclas se incubaron por un periodo de 20 min a temperatura ambiente y los complejos DNA/Proteína fueron separados en electroforesis de gel de poliacrilamida al 6%/TBE 0.5X a 70 volts. Los complejos DNA/proteína fueron visualizados con bromuro de etidio.

Como control negativo, se utilizaron 242 pb de la región estructural del gen rRNA 16S de *Salmonella enterica* serovar Typhi.

13.2.2 EMSAs con LRP

Para realizar ensayos de retardo con la proteína LRP-His₆ se utilizaron diferentes fragmentos de la región promotora de *casA* amplificados por PCR. Como control negativo se empleó nuevamente la región estructural del rRNA 16S. El DNA (100 ng) fue incubado con concentraciones crecientes de LRP en buffer de unión 5X (100 mM de Tris pH 8.0, 2 mM de EDTA, 250 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 62.5% (v/v) de glicerol, 500 mg/ml de BSA y 0.5 mM de DTT). Las reacciones se incubaron por 18 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida 6%/TBE 0.5X a 70 volts. Los complejos DNA/proteína fueron visualizados con bromuro de etidio.

14. BIBLIOGRAFÍA

Agari, Y., Sakamoto, K., Tamakoshi, M., Oshima, T., Kuramitsu, S. and Shinkai, A. 2010. Transcription profile of *Thermus thermophilus* CRISPR systems after phage infection. *J Mol Biol.* **395**:270-281.

Akura, R. and Winans, S. C. 2002. Constitutive mutations of the OccR regulatory protein affect DNA bending in response to metabolites released from plant tumors. *J Biol Chem.* **277**:5866-5874.

Al-Attar, S., Westra, E. R., van der Oost, J. and Brouns, S. J. 2011. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biol Chem.* **392**:1-13.

Alegado, R. A. and Tan, M. W. 2008. Resistance to antimicrobial peptides contributes to persistence of *Salmonella* Typhimurium in the *C. elegans* intestine. *Cell Microbiol.* **10**:1259–73.

Azam, T. and Ishihama, A. 1999. Twelve species of the nucleoid associated protein from *Escherichia coli*: sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J Biol Chem* **274**:33105-33113.

Baek, C., Wang, S., Roland, K. L. and Curtiss III, R. 2009. Leucine-Responsive Regulatory Protein (Lrp) acts as a virulence repressor in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* **191**:1278–1292.

Babu, M., Beloglazova, N., Flick, R., Graham, C., Skarina, T., Nocek, B., Gagarinova, A., Pogoutse, O., Brown, G., Binkowski, A., Phanse, S., Joachimiak, A., Koonin, E. V., Savchenko, A., Emili, A., Greenblatt, J., Edwards, A. M. and Yakunin, A. F. 2009. A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. *Mol Microbiol.* **79**:484-502.

Bagasra, O. and Prilliman, K. R. 2004. RNA interference: the molecular immune system. *J Mol Histol.* **35**:545-553.

- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. and Horvath, P.** 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. **315**:1709-1712.
- Behlau, I. and Miller, S. I.** 1993. A PhoP-repressed gene promotes *Salmonella* Typhimurium invasion of epithelial cells. *J Bacteriol*. **175**:4475–4484.
- Blanc-Potard, A. B. and Groisman, E. A.** 1997. The *Salmonella* *selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J*. **17**:5376-5385.
- Bloch, V., Yang, Y., Margeat, E., Chavanieu, A., Augé, M. T., Robert, B., Arold, S., Rimsky, S. and Kochoyan, M.** 2003. The H-NS dimerization domain defines a new fold contributing to DNA recognition. *Nature Struct Biol*. **10**:212-218.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. and Ehrlich, S. D.** 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. **151**:2551-2661.
- Brinkman, A. B., Ettema, T. J., De Vos, W. M. and van der Oost, J.** 2003. The Lrp family of transcriptional regulators. *Mol Microbiol*. **48**:287-294.
- Brouns, S. J., Matthijs, M. J., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A., Dickman, M., Marakova, K., Koonin, E., and van der Oost, J.** 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. **321**:960-963.
- Buchmeier, N. A. and Heffron, F.** 1991. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella* Typhimurium. *Infect Immun*. **59**:2232–2238.
- Burn, J. E., Hamilton, W. D., Wootton, J. C. and Johnston, A. W.** 1989. Single and multiple mutations affecting properties of the regulatory gene *nodD* of *Rhizobium*. *Mol Microbiol*. **3**:1567-1577.
- Calva, E.** 2001. *Salmonella* Typhi y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. Capítulo 7. Microbios en línea. Esperanza Martínez Romero y Julio César Martínez Romero (eds). UNAM, CIFN. México, D.F.
- Calvo, J. M. and Matthews, R. G.** 1994. The leucine-response regulatory protein: a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*. **58**:466-490.

- Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R. and Rahme, L. G.** 2001. A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**:14613-14618.
- Carte, J., Wang, R., Li, H., Terns, R. M. and Terns, M. P.** 2008. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev*. **22**:3489-3496.
- Chen, C. C., Ghole, M., Majumder, A., Wang, Z., Chandana, S. and Wu, H. Y.** 2003. LeuO-mediated transcriptional derepression. *J Biol Chem*. **278**:38094-38103.
- Chylinski, K., Deltcheva, E., Gonzales, K. and Charpentier, E.** 2010. CRISPR of the human pathogen *Streptococcus pyogenes* confers immunity against invading virulence factor-encoding lysogenic phages. Meeting CRISPR Mechanisms and Applications.
- Colyer, T. E. and Kredich, N. M.** 1991. Characterization of constitutive CysB protein interactions with cys promoters of *S. Typhimurium*. *Ann Meeting Am Soc Microbiol*. p 164. Abstr H-57.
- Crump, J. A., Luby, S. P. and Mintz, E. D.** 2004. The global burden of typhoid fever. *Bulletin of WHO*. **82**:346-353.
- Dame, R. T., Wyman, C., Wurm, R., Wagner, R. and Goosen, N.** 2002. Structural basis for H-NS mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1. *J Biol Chem*. **277**:2146–2150.
- Datsenko, K., and Wanner, B.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**:6640-6645.
- De la Cruz, M. A., Fernández-Mora, M., Guadarrama, C., Flores-Valdez, M. A, Bustamante, V. H., Vázquez, A., and Calva, E.** 2007. LeuO antagonizes H-NS and StpA-dependent repression in *Salmonella enterica ompS1*. *Mol Microbiol*. **66**:727-743.
- Deghmane, A. E., Giorgini, D., Larribe, M., Alonso, J. M. and Taha, M. K.** 2002. Down-regulation of pili and capsule of *Neisseria meningitidis* upon contact with epithelial cells is mediated by CrA regulatory protein. *Mol Microbiol* **43**:1555-1564.

- Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S. and Hensel, M.** 1999. Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol.* **31**:1759–1773.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J. and Charpentier, E.** 2011. CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* **471**:602-607.
- Dersch, P., Schmidt, K. and Bremer, E.** 1993. Synthesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation. *Mol Microbiol.* **8**:875–889.
- Dillon, S. C. and Dorman, C. J.** 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol.* **8**:185-195.
- Dorman, C. J.** 2004. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol.* **2**:391-400.
- Dorman, C. J.** 2007. H-NS, the genome sentinel. *Nat Rev Microbiol.* **5**:157-161.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. and Hinton, J. C.** 2003. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol.* **47**:103-118.
- Ernsting, B. R., Atkinson, M. R., Ninfa, A. J. and Matthews, R. G.** 1992. Characterization of the regulon controlled by the leucine-responsive regulatory protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **174**:1109-1118.
- Fang, M., Majumder, A., Tsai, K., and Wu, H.** 2000. ppGpp-dependent *leuO* expression in bacteria under stress. *Biochem Biophys Res Commun.* **276**:64-70.
- Fass, E. and Groisman, E. A.** 2009. Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Microbiology.* **12**:1-6.
- Faucher, S. P., Curtiss, III R. and Daigle, F.** 2005. Selective capture of *Salmonella enterica* serovar Typhi genes expressed in macrophages that are absent from the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genome. *Infect Immun.* **73**:5217–5221.

- Fernández-Mora, M., Puente, J. and Calva, E.** 2004. OmpR y LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* serovar Typhi *ompS2* porin gene. *J Bacteriol.* **186**:2909-2920.
- Figuroa, I. y Verdugo, A.** 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* **47**:25-42.
- Flores-Valdez, M. A., Puente, J. L. and Calva, E.** 2003. Negative osmoregulation of the *Salmonella ompS1* porin gene independently of OmpR in an *hns* background. *J Bacteriol.* **185**:6497-6506.
- Frank, M. M., Joiner, K. and Hammer, C.** 1987. The function of antibody and complement in the lysis of bacteria. *Rev Infect Dis.* **Suppl 5**:S537-S545.
- Graeme-Cook, K. A., May, G., Bremer, E. and Higgins, C. F.** 1989. Osmotic regulation of porin expression: a role for DNA supercoiling. *Mol Microbiol.* **3**:1287–1294.
- Gulig, P. A.** 1996. Pathogenesis of systemic disease, en *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology. Editor Neidhardt, F. C. ASM Press. 2774-2802.
- Gunn, J. S., Belden, W. J. and Miller, S. I.** 1998. Identification of PhoP–PhoQ activated genes within a duplicated region of the *Salmonella* Typhimurium chromosome. *Microb Pathog.* **25**:77–90.
- Guo, L., Lim, K. B., Gunn, J. S., Bainbridge, B., Darveau, R. P., Hackett, M. and Miller, S. I.** 1997. Regulation of lipid A modifications by *Salmonella* Typhimurium virulence genes *phoP–phoQ*. *Science.* **276**:250–253.
- Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F. and Nelson, K. E.** 2005. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol.* **1**:e60.
- Hansen-Wester, I. and Hensel, M.** 2001. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect.* **3**:549-559.
- Harrison, J. A., Pickard, D., Higgins, C. F., Khan, A., Chatfield, S. N., Aii, T., Dorman, C. J., Hormaeche, C. E. and Dougan, G.** 1994. Role of *hns* in the virulence phenotype of pathogenic salmonellae. *Mol Microbiol.* **13**:133-140.

- Haurwitz, R. E., Jinek, M., Wiedenheft, B., Zhou, K. and Doudna, J. A.** 2010. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*. **329**:1355-1358.
- Heffernan, E. J., Reed, S., Hackett, J., Fierer, J., Roudier, C. and Guiney, D.** 1992. Mechanism of resistance to complement-mediated killing of bacteria encoded by the *Salmonella Typhimurium* virulence plasmid gene *rck*. *J Clin Invest*. **90**:953-964.
- Henikoff, S., Haughn, G., Calvo, K., and Wallance, J.** 1988. A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci*. **85**:6602-6606.
- Hernández-Lucas, I., Gallego-Hernández, A. L., Encarnación, S., Fernández-Mora, M., Martínez-Batallar, A. G., Salgado, H., Oropeza, R., and Calva, E.** 2008. The LysR-type transcriptional regulator LeuO controls the expression of several genes in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Bacteriol*. **190**:1658-1670.
- Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertury, A., Caer, J. P., Danchin, A. and Bertin, P.** 2001. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol*. **40**:20-36.
- Hornick, R. B., Greisman, S. E., Woodward, T. E., DuPont, H. L., Dawkins, A.T. and Snyder, M. J.** 1970. Typhoid fever: pathogenesis and immunologic control. *N Engl J Med*. **283**:691739–691746.
- Jansen, R., van Embden, J. D., Gaastra, W. and Schouls, L. M.** 2002a. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. *OMICS*. **6**:23-33
- Jansen, R., Jan, D. A., van Embden, D. A., Gaastra, W. and Schouls, L. M.** 2002b. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*. **43**:1565-1575.
- Jauregui, R., Abreu-Goodger, C., Moreno-Hagelsieb, G., Collado-Vides, J. and Merino, E.** 2003. Conservation of DNA curvature signals in regulatory regions of prokaryotic genes. *Nucleic Acids Res*. **31**:6770–6777.
- Jore, M. M., Lundgren, M., van Duijn, E., Bultema, J. B., Westra, E. R., Waghmare, S. P., Wiedenheft, B., Pul, U., Wurm, R., Wagner, R., Beijer, M. R., Barendregt, A., Zhou,**

- K., Snijders, A. P., Dickman, M. J., Doudna, J. A., Boekema, E. J., Heck, A. J., van der Oost, J. and Brouns, S. J.** 2011. Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nat Struct Mol Biol.* **18**:529-536.
- Kang, J. W., Kwon, A. R., Kim, D. A. and Choi, E. C.** 2001. Cloning and sequencing of the *astA* gene encoding arylsulfate sulfotransferase from *Salmonella* Typhimurium. *Bio Pharm Bull.* **24**:570-574.
- Karavolos, M. H., Spencer, H., Bulmer, D. M., Thompson, A., Winzer, K., Williams, P., Hinton, J. C. and Khan, C. M.** 2008. Adrenaline modulates the global transcriptional profile of *Salmonella* revealing a role in the antimicrobial peptide and oxidative stress resistance responses. *BMC Genomics.* **9**:458.
- Karginov, F. V. and Hannon, G. J.** 2010. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol Cell.* **37**:7-19.
- Kim, Y. H., Lee, Y., Kim, S., Yeom, J., Yeom, S., Seok-Kim, B., Oh, S., Park, S., Jeon, CO. and Park, W.** 2006. The role of periplasmic antioxidant enzymes (superoxide dismutase and thiol peroxidase) of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the formation of biofilms. *Proteomics.* **6**:6181-93.
- Kim, S. I., Jourlin-Castelli, C., Wellington, S. R. and Sonenshein, A. L.** 2003. Mechanism of repression by *Bacillus subtilis* CcpC, a LysR family regulator. *J Mol Biol.* **334**:609-624.
- Klauck, E., Bohringer, J. and Hengge-Aronis, R.** 1997. The LysR-like regulator LeuO in *Escherichia coli* is involved in the translational regulation of *rpoS* by affecting the expression of the small regulatory DsrA-RNA. *Mol Microbiol.* **25**:559-569.
- Knodler, L. A. and Steele-Mortimer, O.** 2003. Taking possession: biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic.* **4**:587-599.
- Kothari, A., Pruthi, A. and Chugh, T. D.** 2008. The burden of enteric fever. *J Infect Develop Countries.* **2**:253-259.

- Kovacikova, G. and Skorupski, K.** 1999. A *Vibrio cholerae* LysR homolog, AphB, cooperates with AphA at the *tcpPH* promoter to activate expression of the ToxR virulence cascade. *J Bacteriol.* **181**:4250-4256.
- Kunin, V., Sorek, R. and Hugenholtz, P.** 2007. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol.* **8**:R61.
- Kwon, A. R., Oh, T. G., Kim, D.H. and Choi, E.C.** 1999. Molecular cloning of arylsulfate sulfotransferase gene and characterization of its product from *Enterobacter amnigenus* AR-37. *Protein Expr Purif.* **17**:366-372.
- La Teana, A., Brandi, A., Falconi, M., Spurio, R., Pon, C. L. and Gualerzi, C. O.** 1991. Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proc Natl Acad Sci USA.* **88**:10907-10911.
- Labrie, S. J., Samson, J. E. and Moineau, S.** 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol.* **8**:317-327.
- Lahiri, A., Das, P. and Chakravorty, D.** 2008. The LysR-type transcriptional regulator Hrg counteracts phagocyte oxidative burst and imparts survival advantage to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology.* **154**:2837-2846.
- Lahiri, A., Das, P. and Chakravorty, D.** 2009. *Salmonella* Typhimurium: Insight into the multi-faceted role of the LysR-type transcriptional regulators in *Salmonella*. *Int J Biochem Cell Biol.* **41**:2129-2133.
- Landgraf, J., Wu, J., and Calvo, J.** 1996. Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **178**:6930-6936.
- Lang, B., Blot, N., Bouffartigues, E., Buckle, M., Geertz, M., Gualerzi, C., Mavathur, R., Muskhelishvili, G., Pon, C., Rimsky, S., Stella, S., Babu, M. and Travers, A.** 2007. High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **35**:6330-6337.
- Lawley, T., Chan, K., Thompson, L., Kim, C., Govoni, G. and Monack, D.** 2006. Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLOS Pathog.* **2**:87-100.

- Lawrenz, M. B. and Miller, V. L.** 2007. Comparative analysis of the regulation of *rovA* from the pathogenic yersiniae. *J Bacteriol.* **189**:5963-5975.
- Le Minor, L. and Popoff, M. Y.** 1987. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Bacteriol.* **37**:465-468.
- Lee, A. K., Detweiler, C. S. and Falkow, S.** 2000. OmpR regulates the two component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol.* **182**:771-781.
- Leonard, P. M., Smits, S. H. J., Brinkman, A. B., de Vos, W. M., van der Oost, J., Rice, D. W. and Rafferty, J. B.** 2000. Crystal structure of the Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *EMBO J.* **20**:990-997.
- Lillestøl, R. K., Redder, P., Garrett, R. A. and Brugger, K.** 2006. A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea.* **2**:59–72.
- Louwen, R., Horst-Kreft, D., Heikema, A., Fuentes, S., van Putten, J., de Knecht, G., Hoogenboezem, T., Endtz, H. P., Wells, J., van wamel, W., van Baarlen, P., Nieuwenhuis, E. and van Belkum, A.** 2010. *In vitro* characterization of the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) related gene Cj1523 (Csn1) in *C. jejuni*. Meeting CRISPR Mecanisms and Applications.
- Lucchini, S., Rowley, G., Goldberg, M. D., Hurd, D., Harrison, M. and Hinton, J. C.** 2006. H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog.* **2**:e81.
- Lucchini, S., McDermott, P., Thompson, A. and Hinton, J. C.** 2009. The H-NS-like protein StpA represses the RpoS (sigma 38) regulon during exponential growth of *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol.* **74**:1169-1186.
- Maddocks, S. E. and Oyston, P. C.** 2008. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology.* **54**:3609-3623.
- Majumder, A., Fang, M., Tsai, K. J., Ueguchi, C., Mizuno, T. and Wu, H. Y.** 2001. LeuO expression in response to starvation for branched-chain amino acids. *J Biol Chem.* **276**:19046-19051.

Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I. and Koonin, E. V. 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct.* **1**:7.

Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., van der Oost, J. and Koonin, E. V. 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* **9**:467-477.

Mangan, M. W., Lucchini, S., O Croinin, T., Fitzgerald, S., Hinton, J. C. and Dorman, C. J. 2011. The nucleoid-associated protein HU controls three regulons that coordinate virulence, response to stress and general physiology in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology.* doi:10.1099/mic.0.046359-0.

Marraffini, L. A. and Sontheimer, E. J. 2008. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* **322**:1843-1845.

Marraffini, L. A. and Sontheimer, E. J. 2010. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature.* **463**:568-571.

Marshall, D., Sheehan, B. and Dorman, C. 1999. A role for the leucine-responsive regulatory protein and integration host factor in the regulation of the *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) locus in *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol.* **34**:134-45.

Mayer, O., Rajkowitsch, L., Lorenz, C., Konrat, R. and Schroeder, R. 2007. RNA chaperone activity and RNA-binding properties of the *E. coli* protein StpA. *Nucleic Acids Res.* **35**:1257-1269.

Mireles, J. R., Toguchi, A., and Harshey, R. M. 2001. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J Bacteriol.* **183**:5848–5854.

Mirza, S. H., Beeching, N. J. and Hart, C. A. 1996. Multi-drug resistant typhoid: a global problem. *J Med Microbiol.* **44**:317-319.

- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E. and Juez, G.** 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol.* **36**:244–246.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. and Soria, E.** 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* **60**:174-182.
- Moorthy, S., and Watnick, P.** 2005. Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Mol Microbiol.* **56**:1623-1635.
- Navarre, W. W. Porwollik, S., Wang, Y., McClelland, M., Rosen, H., Libby, S. J. and Fang, F. C.** 2006. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. *Science.* **313**:236-238.
- Nystrom, T., Larsson, C. and Gustafsson, L.** 1996. Bacterial defense against aging: role of the *Escherichia coli* ArcA regulator in gene expression, readjusted energy flux and survival during stasis. *EMBO J.* **15**:3219–3228.
- O'byrne, C. P. and Dorman, C. J.** 1994. Transcription of the *Salmonella typhimurium* spv virulence locus is regulated negatively by the nucleoid-associated protein H-NS. *FEMS Microbiol Lett.* **121**:99-105.
- Osborne, S. E., Walthers, D., Tomljenovic, A. M., Mulder, D. T., Silphaduang, U., Duong, N., Lowden, M. J., Wickham, M. E., Waller, R. F., Kenney, L. J. and Coombes, B. K.** 2009. Pathogenic adaptation of intracellular bacteria by rewiring a *cis*-regulatory input function. *Proc Natl Acad Sci USA.* **106**:3982-3987.
- Oshima, T., Ishikawa, S., Kurokawa, K., Aiba, A. and Ogasawara, N.** 2006. *Escherichia coli* histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase. *DNA Res.***13**:141-153.
- Otto, K. and Hermansson, M.** 2004. Inactivation of *ompX* causes increased interactions of type 1 fimbriated *Escherichia coli* with abiotic surfaces. *J Bacteriol.* **186**:226-234.

- Pérez-Rueda, E. and Collado-Vides, J.** 2000. The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **28**:1838-47.
- Plagens, A., Vorwerk, S., Tjaden, B. and Hensel, R.** 2010. CRISPR/Cas in *Thermoproteus tenax*: a multifunctional system? Meeting CRISPR Mechanisms and Applications.
- Platko, J. V., and Calvo, J. M.** 1993. Mutations affecting the ability of *Escherichia coli* Lrp to bind DNA, activate transcription, or respond to leucine. *J Bacteriol.* **175**:1110-1117.
- Poranen, M. M., Ravantti, J. J., Grahn, A. M., Gupta, R., Auvinen, P. and Bamford, D. H.** 2006. Global changes in cellular gene expression during bacteriophage PRD1 infection. *J Virol.* **80**:8081-8088.
- Puente, J. L., Flores, V., Fernández, M., Fuchs, Y. and Calva, E.** 1987. Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene.* **61**:75-83.
- Pul, U., Wurm, R., Lux, B., Meltzer, M., Menzel, A. and Wagner, R.** 2005. LRP and H-NS – cooperative patterns for transcription regulation at *Escherichia coli* rRNA promoters. *Mol Microbiol.* **58**:864-876.
- Pul, U., Wurm, R., Arslan, Z., Geissen, R., Hofmann, N. and Wagner, R.** 2010. Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. *Mol Microbiol.* **7**:1495-1512.
- Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D. and Farmer, J. J 3rd.** 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol.* **27**:313–320.
- Rex, J. H., Aronson, B. D. and Somerville, R. L.** 1991. The *tdh* and *serA* operons of *E. coli*: mutational analysis of the regulatory elements of leucine-responsive genes. *J Bacteriol.* **173**:5944-5953.
- Rimsky, S., Zuber, F., Buckle, M. and Buc, H.** 2001. A molecular mechanism for the repression of transcription by the H-NS protein. *Mol Microbiol.* **42**:1311-1323.

- Rosenshine L. M., Tung, S. L., Wang, X. H., Friedberg, D., Hew, C. L. and Leung, K. Y.** 2004. Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli* strains and their *ihf* and *ler* mutants. *Appl Environ Microbiol.* **70**:5274-5282.
- Russell, D. A., Byrne, G. A., O'Connell, E. P., Boland, C. A. and Meijer, W. G.** 2004. The LysR-type transcriptional regulator VirR is required for expression of the virulence gene *vapA* of *Rhodococcus equi* ATCC 33701. *J Bacteriol.* **186**:5576-5584.
- Rychlik, I. and Barrow, P. A.** 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiol Rev.* **29**:1021-1040.
- Sánchez-Jiménez, M. M. y Cardona-Castro, N. M.** 2003. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infectio.* **7**: 2-29.
- Sharma, A. and Qadri, A.** 2004. Vi polysaccharide of *Salmonella typhi* targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**:17492-17497.
- Schell, M. A., Brown, P. H. and Raju, S.** 1990. Use of saturation mutagenesis to localize probable functional domains in the NahR protein, a LysR-type transcription activator. *J Biol Chem.* **265**:3844-3850.
- Schell, M. A.** 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol.* **47**:593-626.
- Schlaman, H. R., Okker, R. J. and Lugtenberg, B. J.** 1992. The NodD protein does not bind to the promoters inducible nodulation genes in extracts of bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *J Bacteriol* **147**:6109-6116.
- Shi, X. and Bennett, G. N.** 1995. Effects of multicopy LeuO on the expression of the acid-inducible lysine decarboxylase gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **177**:810-814.
- Shimada, T., Yamamoto, K. and Ishihama, A.** 2009. Involvement of leucine-response transcription factor LeuO in regulation of the genes for sulfa-drug efflux. *J Bacteriol.* **14**:4562-4571.

- Sinkunas, T., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P. and Siksnys, V.** 2011. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO J.* **30**:1335-1342.
- Sorek, R., Kunin, V. and Hugenoltz, P.** 2008. CRISPR-a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Re. Microbiol.* **6**:181-186.
- Spurio, R., Dürrenberger, M., Falconi, M., La Teana, A., Pon, C. L. and Gualerzi, C. O.** 1992. Lethal overproduction of the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS: ultramicroscopic and molecular autopsy. *Mol Gen Genet.* **231**:201–211.
- Spurio, R., Falconi, M., Brandi, A., Pon, C. L. and Gualerzi, C. O.** 1995. The oligomeric structure of nucleoid protein H-NS is necessary for recognition of intrinsically curved DNA and for DNA bending. *EMBO J.* **16**:1795–1805.
- Stancik, L. M., Stancik, D. M., Schmidt, B., Barnhart, D. M., Yoncheva, Y. N. and Slonczewski, J. L.** 2002. pH-dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **184**:4246-58.
- Storz, G., Tartaglia, L. A. and Ames, B. N.** 1990. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science.* **248**:189-194.
- Stratmann, T., Madhusudan, S. and Schnetz, K.** 2008. Regulation of the *yjjQ-bglJ* operon, encoding LuxR-Type transcription factors, and the divergent *yjjP* gene by H-NS and LeuO. *J Bacteriol.* **190**:926-935.
- Sun, J. and Klein, A.** 2004. A LysR-type regulator is involved in the negative regulation of genes encoding selenium-free hydrogenases in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Mol Microbiol.* **52**:563-571.
- Sutherland, L., Cairney, J., Elmore, M. J., Booth, I. R. and Higgins, C. F.** 1986. Osmotic regulation of transcription: induction of the *proU* betaine transport gene is dependent on accumulation of intracellular potassium. *J Bacteriol.* **168**:805–814.
- Tendeng, C. and Bertin, P.** 2003. H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins. *Trends Microbiol.* **11**:511–518.

- Tenor, J., McCormick, B., Ausubel, F., and Aballay, A.** 2004. *Caenorhabditis elegans*-based screen identifies *Salmonella* virulence factors required for conserved host-pathogen interactions. *Curr Biol.* **14**:1018-1024.
- Terns, M. P. and Terns, R. M.** 2011. CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol.* **14**:1-7.
- Toguchi, A., Siano, M., Burkart, M., and Harshey, R. M.** 2000. Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *J Bacteriol.* **182**: 6308–6321.
- Touchon, M. and Rocha, E.** 2010. The small, slow and specialized CRISPR and Anti-CRISPR of *Escherichia* and *Salmonella*. *PLoS One.* **6**:e11126.
- Troxell, B., Sikes, M. L., Fink, R. C., Vázquez-Torres, A., Jones-Carson, J. and Hassan, H. M.** 2011. Fur negatively regulates *hns* and is required for the expression of HilA and virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* **193**:497–505.
- Ueguchi, C., Kakeda, M. and Mizuno, T.** 1993. Autoregulatory expression of the *Escherichia coli hns* gene encoding a nucleoid protein: H-NS functions as a repressor of its own transcription. *Mol Gen Genet.* **236**:171–178.
- Ueguchi, C., Suzuki, T., Yoshida, T., Tanaka, K. and Mizuno, T.** 1996. Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J Mol Biol.* **263**:149-162.
- Ueguchi, C., Seto, C., Suzuki, T. and Mizuno, T.** 1997. Clarification of the dimerization domain and its functional significance for the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J Mol Biol.* **274**:145–151.
- Ueguchi, C., Ohta, T., Seto, C., Suzuki, T. and Mizuno, T.** 1998. The *leuO* gene product has a latent ability to relieve *bgl* silencing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **180**:190–193.
- Unden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Holighaus, G., Schirawski, J. and Six, S.** 1995. O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. *Arch Microbiol.* **164**:81–90.

- van der Oost, J., Jore, M. M., Westra, E. R., Lundgren, M. and Brouns, S. J.** 2009. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem Sci.* **34**:401-407.
- VanBogelen, R. A., Olson, E. R., Wanner, B. L. and Neidhardt, F. C.** 1996. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **178**: 4344-4366.
- Waterman, S. R. and Holden, D. W.** Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol.* **5**:501-11.
- Wang, Q., and Calvo, J. M.** 1993. Lrp, a global regulatory protein of *E. coli*, binds cooperatively to multiple sites and activates transcription of *ilvH*. *J Mol Biol.* **229**:306-318.
- Westra, E. R., Pul, U., Heidrich, N., Jore, M. M., Lundgren, M., Stratmann, T., Wurm, R., Raine, A., Mescher, M., Van Heereveld, L., Mastop, M., Wagner, E. G., Schnetz, K., van der Oost, J., Wagner, R. and Brouns, S. J.** 2010. H-NS mediated repression of CRISPR-based immunity in *Escherichia coli* K12 can be relieved by the transcription activator LeuO. *Mol Microbiol.* **77**:1380-1393.
- Wiedenheft, B., Zhou, K., Jinek, M., Coyle, S. M., Ma, W. and Doudna, J. A.** 2009. Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense. *Structure.* **17**:904-912.
- Wilson, R. L., Libby, S. J., Freet, A. M., Boddicker, J. D., Fahlen, T. F. and Jones, B. D.** 2001. Fis, a DNA nucleoid-associated protein, is involved in *Salmonella* Typhimurium SPI-1 invasion gene expression. *Mol Microbiol.* **39**:79-88.
- Yoon, H., Lim, S., Heu, S., Choi, S. and Ryu, S.** 2003. Proteome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *fis* mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**:391-396.
- Zhang, A. X., Rimsky, S., Reaban, M. E., Buc, H. and Belfort, M.** 1996. *Escherichia coli* protein analogs StpA and H-NS: Regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics. *EMBO J.* **15**:1340–1349.
- Zhang, L., Rozek, A. and Hancock, R. E.** 2001. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J Biol Chem.* **276**:35714–35722.

Zhang X. L., Tsui, I. S., Yip, C. M., Fung, A. W., Wong, D. K., Dai, X., Yang, Y., Hackett, J. and Morris, C. 2000. *Salmonella enterica* serovar Typhi uses type IVB pili to enter human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **68**:3067-3073.

Zhang, X. L., Jeza, V. T., y Pan, Q. 2008. *Salmonella* Typhi: from a human pathogen to a vaccine vector. *Cell. Mol. Immunol.* **5**:91-97.

Zhou, D. and Galán, J. 2001. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect.* **3**:1293-1298.