



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

Departamento de Microbiología Molecular

**Papel del sistema de dos componentes CpxR/A en la cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 en *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium**

## **T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**IRENE JAQUELIN PALACIOS VELÁZQUEZ**

TUTOR

**DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

**DRA. CINTHIA E. NÚÑEZ LÓPEZ – INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DR. MARIO SOBERÓN CHÁVEZ – INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente proyecto de investigación se realizó en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Víctor H. Bustamante Santillán.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dra. Cinthia E. Núñez López  
Dr. Mario Soberón Chávez

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Presidente	Dr. David Romero Camarena
Secretario	Dra. Clarita Olvera Carranza
Vocal	Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo
Vocal	Dr. Enrique Merino Pérez
Vocal	Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Durante el desarrollo de esta tesis recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 313054), así como apoyo de proyectos PAPIIT-UNAM (IN210309 y IN205512) y de CONACYT-CB (83277 y 179071) para la realización de mi trabajo de investigación.

## **Dedicatoria y Agradecimientos**

*Le dedico este trabajo a mi madre, mi amiga, quien siempre ha estado a mi lado y me ha apoyado en todos los proyectos que he emprendido en mi vida.*

*A mis tías, mamá Lala, tía Isabel y tía Columba, por ser mujeres trabajadoras y emprendedoras que me motivan día a día a ser mejor.*

*A mi abue, porque siempre me tiene presente en sus bendiciones y porque me llevaba al Kinder en rebozo.*

*A Diego, Fran y Fernando Rojas, gracias por su apoyo y presencia en mi vida.*

*A mi Tutor, Vic, por ser un excelente académico y un gran ser humano.*

*A Doña Au, por alimentarnos y darnos la oportunidad de reír todos los días a la hora de la comida.*

*A mis compañeros de laboratorio, por apoyarme, asesorarme y aguantar mi sonora risa y mis peleas con Ramón.*

*A Luary, por su asesoría en el laboratorio.*

*A mis amigos Arlen y Ramón, quienes me acompañaron en este viaje y ahora los extraño mucho.*

*Y finalmente, con orgullo y respeto le dedico este trabajo al Instituto de Biotecnología y a mi Universidad, la Universidad Nacional Autónoma de México.*

*Por mi raza hablará el espíritu.*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium.....	2
Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i> (SPIs) .....	3
Sistema de secreción tipo III (SST3) .....	7
Patogénesis de <i>Salmonella</i> .....	9
Cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2.....	11
El sistema de dos componentes CpxRA .....	14
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>16</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>22</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
Objetivo general .....	23
Objetivos específicos .....	23
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento .....	24
Oligonucleótidos .....	24
Construcción de fusiones transcripcionales al gen reportero <i>cat</i> .....	29
Construcción de la fusión transcripcional <i>rpoH</i> Δ <i>CpxR</i> -BS· <i>cat</i> .....	32
Construcción del plásmido pK3· <i>CpxR</i> .....	33
Construcción de la cepa <i>S. Typhimurium rpoH</i> Δ <i>CpxR</i> -BS .....	35
Construcción de la cepa <i>S. Typhimurium lon</i> ·FLAG.....	38
Monitoreo de la expresión génica mediante el gen reportero <i>cat</i> .....	39
Inmunodetección de Lon mediante Western Blot.....	41
Perfil de secreción de proteínas de SPI-1 .....	42
Purificación de la proteína CpxR .....	43
Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) .....	44

**RESULTADOS ..... 45**

    CpxR-P reprime específicamente los genes de SPI-1 ..... 45

    CpxR afecta la autoregulación de *hilD* ..... 47

    Es necesaria la presencia de Lon para que CpxR reprima la expresión de los genes de SPI-1 ..... 49

    Efecto de CpxR sobre la expresión de Lon ..... 50

    RpoH regula negativamente la expresión de los genes de SPI-1 ..... 54

    CpxR regula positivamente la expresión de *rpoH* ..... 55

    CpxR reprime la expresión de los genes de SPI-1 de manera independiente a la regulación que ejerce sobre *rpoH*..... 63

**DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES..... 66**

**PERSPECTIVAS ..... 72**

**BIBLIOGRAFÍA ..... 73**

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Organización genética de SPI-1 y SPI-2.	6
Figura 2	Estructura del SST3 de <i>Salmonella</i> .	8
Figura 3	Biología de la infección por <i>Salmonella</i> en humano.	10
Figura 4	Modelo general de la regulación de SPI-1 y SPI-2.	12
Figura 5	El sistema regulador de dos componentes CpxRA	15
Figura 6	Cascada de regulación de los genes de SPI-1 y SPI-2.	17
Figura 7	CpxR reprime la secreción de proteínas codificadas en SPI-1.	19
Figura 8	CpxRA reprime la expresión de <i>hilD</i> , regulando negativamente, de manera indirecta, la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2.	20
Figura 9	Hipótesis del mecanismo por medio del cual CpxR-P reprime la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2.	22
Figura 10	CpxR regula negativamente la expresión de <i>hilD</i> y <i>hilA</i> .	46
Figura 11	CpxR afecta la auto-regulación de <i>hilD</i> .	48
Figura 12	Es necesaria la presencia de Lon para que CpxR reprima la expresión de los genes de SPI-1.	50
Figura 13	Representación esquemática de la organización transcripcional del gen <i>lon</i> de <i>E. coli</i> y de <i>S. Typhimurium</i> .	51
Figura 14	La expresión de la fusión <i>lon-cat</i> no se afecta en la mutante $\Delta cpxA$ o con la sobre-expresión de CpxR.	52
Figura 15	La expresión de las fusiones <i>clpX-cat</i> y <i>clpP-cat</i> no se afecta en la mutante $\Delta cpxA$ .	52
Figura 16	Inmunodetección de Lon-FLAG mediante Western Blot.	53
Figura 17	RpoH regula negativamente la expresión de <i>invF</i> (SPI-1).	54
Figura 18	CpxR regula positivamente la expresión de <i>rpoH</i> .	55
Figura 19	Proteína CpxR-6xHis purificada.	56
Figura 20	Predicción de un sitio de unión de CpxR en la región reguladora de <i>rpoH</i> de <i>E. coli</i> y <i>S. Typhimurium</i> mediante "Virtual Footprinting".	58
Figura 21	Estrategia empleada para generar las cepas <i>S. Typhimurium rpoHΔCpxR-BS::Km<sup>R</sup></i> y <i>S. Typhimurium rpoHΔCpxR-BS::</i> .	59

---

Figura 22	La secuencia predicha como sitio de unión de CpxR en <i>rpoH</i> es necesaria para la regulación positiva de <i>rpoH</i> mediada por este regulador.	60
Figura 23	CpxR regula positivamente la expresión de <i>rpoH</i> al activar el sistema CpxRA de manera natural, para lo cual se requiere de la secuencia predicha como sitio de unión de CpxR localizada en la región reguladora de <i>rpoH</i> .	62
Figura 24	La represión de los genes de SPI-1, mediada por CpxR, es independiente de la regulación que ejerce CpxR sobre <i>rpoH</i> .	64
Figura 25	Esquema que muestra la cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2.	71

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Ejemplos de serotipos de <i>Salmonella enterica</i> ; sus hospederos y las enfermedades que causan	3
Tabla 2	Reguladores involucrados en la virulencia de <i>Salmonella</i>	13
Tabla 3	Breve descripción de la función de los reguladores involucrados en la cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2.	18
Tabla 4	Cepas y plásmidos empleados en este estudio	25
Tabla 5	Oligonucleótidos empleados en este estudio	27

## I. RESUMEN

La mayoría de los genes involucrados en la virulencia de *Salmonella* están codificados en regiones particulares de su genoma, conocidas como islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs, por *Salmonella Pathogenicity Islands*). Los genes de SPI-1 son necesarios para que *S. Typhimurium* invada células del epitelio intestinal y, por lo tanto, para establecer la infección intestinal. Los genes de SPI-2 son requeridos para la replicación y supervivencia de la bacteria dentro de macrófagos y, por lo tanto, para el establecimiento de la infección sistémica.

En este trabajo analizamos el papel del sistema de dos componentes CpxR/A sobre la expresión de los genes de SPI-1, empleando fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, ensayos de Western blot, perfiles de secreción de proteínas y análisis bioinformáticos.

Planteamos la hipótesis de que CpxR reprime en cascada la expresión de los genes de SPI-1, al inducir directamente la expresión del factor sigma alternativo RpoH, el cual incrementaría la expresión de la proteasa Lon que degrada a HilD, el regulador positivo central de la cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2.

Los resultados generados en este estudio muestran que CpxR regula positivamente la expresión de *rpoH*, lo cual requiere de la secuencia consenso de unión de CpxR, localizada corriente arriba del promotor P1 de *rpoH*. Además, nuestros resultados confirman que se requiere de la presencia de Lon para la represión de los genes de SPI-1 mediada por CpxR; sin embargo, CpxR no afecta la expresión de Lon, o no lo hace directamente. Así mismo, nuestros resultados sugieren que CpxR puede reprimir a los genes de SPI-1 por una vía independiente de la regulación que ejerce sobre *rpoH*.

Nuestros resultados indican que CpxR podría reprimir la expresión de los genes de SPI-1 no sólo por el mecanismo que inicialmente propusimos, es decir, induciendo la expresión de RpoH, sino también por al menos una vía adicional que no involucra la regulación de CpxR sobre *rpoH*.

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium.

El género *Salmonella*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, se divide en dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*. *S. enterica* se divide en seis subespecies: *enterica* (subespecie I), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV), *indica* (IV) y *salamae* (II) (Brenner *et al.*, 2000). Los serotipos de *Salmonella* se distinguen mediante anticuerpos contra dos antígenos de superficie, los cuales son ampliamente variables. Uno de ellos es el antígeno O, el cual refleja variación en la parte expuesta del lipopolisacárido, y el otro es el antígeno H, el cual refleja variación en la flagelina, la proteína mayoritaria del flagelo, con aproximadamente 46 y 114 formas antigénicas reconocidas, respectivamente (Grimont y Weill, 2007; McQuiston *et al.*, 2004). La mayoría de las especies de *Salmonella* poseen dos genes de flagelina que codifican para las variantes H1 y H2 del antígeno H. Se han reportado más de 2500 serotipos (cada uno con una combinación única de los antígenos O, H1 y H2 (Grimont y Weill, 2007).

La infección por *Salmonella* es una de las infecciones transmitidas por los alimentos más comunes a nivel mundial, por lo que representa un importante problema de salud pública, tanto en países en vías de desarrollo, como en países industrializados, con aproximadamente 1.4 millones de casos anuales sólo en Estados Unidos (Voetsch *et al.*, 2004).

La mayoría de serotipos causantes de enfermedad pertenecen a la subespecie *enterica*, entre los serotipos más importantes, respecto a la salud humana, están Typhi, Paratyphi, Typhimurium y Enteritidis (Anjum *et al.*, 2005) (Tabla 1).

**Tabla 1** (Haraga, *et al.*, 2008). Ejemplos de serotipos de *Salmonella enterica*; sus hospederos y las enfermedades que causan

Serotipo de <i>S. enterica</i>	Hospedero	Enfermedad y síntomas
<b>Tifoideo</b>		
<b>Typhi;</b> <b>Paratyphi</b>	Restringido a humanos	Fiebre entérica: fiebre, dolor abdominal; diarrea transitoria o constipación; salpullido maculopapular color salmón en el torso.
<b>No tifoideo</b>		
<b>Typhimurium;</b> <b>Enteritidis</b>	Amplio rango	Gastroenteritis; dolor abdominal; vómito y diarrea inflamatoria.

Así pues, *Salmonella enterica* agrupa a bacterias Gram negativas patógenas de humanos y animales, que pueden ocasionar desde infecciones intestinales localizadas, que producen diarrea, hasta infecciones sistémicas severas, como la fiebre tifoidea. *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*) puede ocasionar los dos tipos de infección, dependiendo de su hospedero (Haraga *et al.*, 2008). Debido a esto, se ha empleado como modelo para el estudio de los mecanismos moleculares por medio de los cuales *Salmonella* interactúa con las células del hospedador, provocando así los signos y síntomas clínicos de las infecciones.

## 2. Islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs)

La mayoría de los genes necesarios para la virulencia de *Salmonella* están codificados en regiones particulares de su genoma, conocidas como islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs, por *Salmonella Pathogenicity Islads*). Se ha propuesto que *Salmonella* adquirió estas islas de patogenicidad mediante transferencia horizontal de DNA proveniente de otras especies bacterianas. Esta hipótesis se basa en la significativa diferencia en el contenido de G+C de las islas, comparada con el resto del genoma de *Salmonella* y, en los remanentes de bacteriófagos, transposones o secuencias de inserción que comúnmente se encuentran en los límites de las islas. A la fecha, se han descrito al menos 17 diferentes SPIs, algunas están conservadas en el género *Salmonella*, mientras

que otras son específicas de ciertos serotipos (Marcus *et al.*, 2000; Porwollik *et al.*, 2002). SPI-1 y SPI-2 son las mejor caracterizadas y estudiadas; también son las únicas que codifican un Sistema de Secreción Tipo 3 (SST3), un complejo de proteínas que forman una estructura en forma de aguja a través de la cual la bacteria “inyecta” proteínas efectoras al interior de las células del hospedero (Hansen-Wester y Hensel, 2001; Haraga *et al.*, 2008).

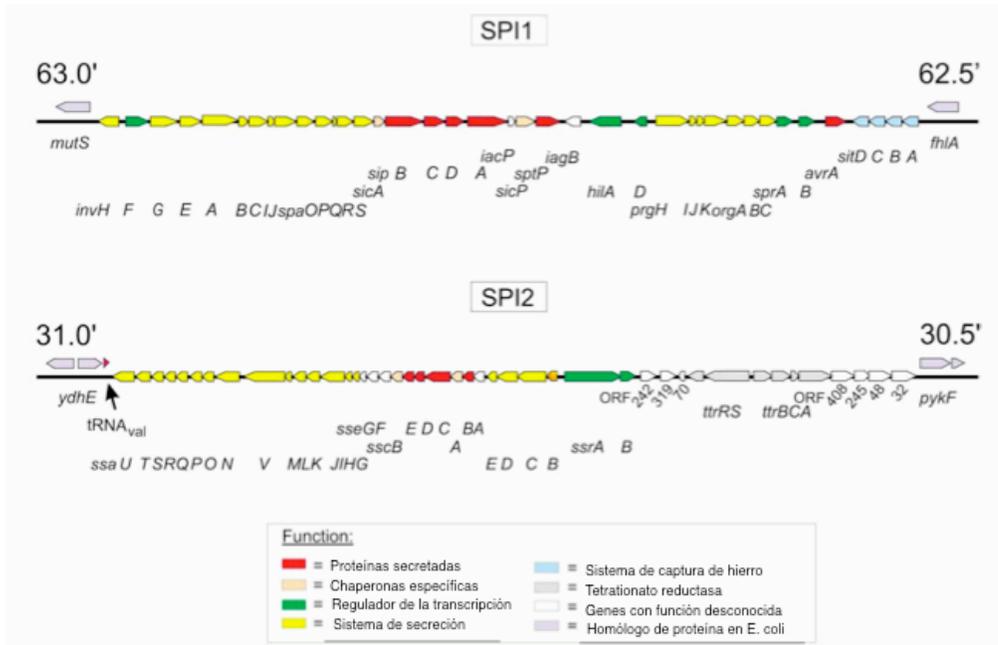
## SPI-1

SPI-1 es una región de 40 kb, con un contenido de G+C significativamente menor al promedio del contenido de G+C de todo el genoma de *Salmonella*, 47% y 52%, respectivamente (Mills *et al.*, 1995; Galán *et al.*, 2001). Se han identificado 39 genes en SPI-1, que codifican para un SST3 (Zhou *et al.*, 1999), para proteínas efectoras y para reguladores transcripcionales de la expresión de estos genes, necesarios para la invasión de *Salmonella* y para el establecimiento de la infección intestinal (Figura 1). Las proteínas efectoras son las proteínas secretadas al medio y translocadas al citoplasma de las células hospederas a través del SST3. SPI-1 se conserva en los diferentes serotipos de *S. enterica* y en la especie ancestral *S. bongori*, lo que sugiere que SPI-1 se adquirió en una etapa evolutiva temprana de *Salmonella*, lo que marcó su divergencia de *Escherichia coli* (Porwollik *et al.*, 2002). Se ha observado un elevado grado de similitud de secuencia entre los genes que codifican para el SST3 de SPI-1 y el conjunto de genes *mxi/spa*, codificados en un plásmido de virulencia e implicados en la invasión de *Shigella spp.* (Groisman y Ochman, 1993).

## SPI-2

El locus de SPI-2 es una región de 40 kb adyacente al gen del tRNA *val*V (Hensel *et al.*, 1997a) (Figura 1). Esta isla de patogenicidad tiene una estructura en mosaico, pues se compone de al menos dos elementos distintos (Hensel *et al.*, 1999b). Una porción de 25 kb es esencial para la replicación intracelular de *Salmonella* y, por lo tanto, para la infección sistémica. Esta región codifica un segundo SST3 y posee un contenido de G+C de 43%. Esta parte de SPI-2 se encuentra en *S. enterica* pero no en *S. bongori*, lo que indica que se adquirió en una etapa evolutiva posterior a la adquisición de SPI-1 (Porwollik *et al.*, 2002). Una segunda porción de SPI-2, con un tamaño de 15 kb, ha sido identificada tanto en *S. enterica* como en *S. bongori*. Este elemento tiene un contenido de G+C del 54%, no es esencial para la virulencia sistémica y codifica a la tetratoato reductasa (Ttr), involucrada en la respiración anaerobia (Hensel *et al.*, 1999a).

En *Yersinia pestis* se identificó un locus cromosomal que presenta similitud a SPI-2 (Parkhill *et al.*, 2001). Así mismo, se ha encontrado relación del SST3 de SPI-2 con el SST3 de *E. coli* enteropatógena, pero únicamente se observa una relación distante de éste con el SST3 codificado en SPI-1 (Hensel *et al.*, 1997b; Foultier *et al.*, 2002). Esta observación apoya el hecho de que los SST3 codificados en SPI-1 y SPI-2 fueron adquiridos mediante eventos independientes de transferencia horizontal de genes, y no son el resultado de la duplicación génica (Hensel, 2004).



**Figura 1** (Hansen-Wester y Hensel, 2001). Organización genética de SPI-1 y SPI-2. Las clases funcionales de los genes de SPI-1 y SPI-2 se representan mediante diferentes colores.

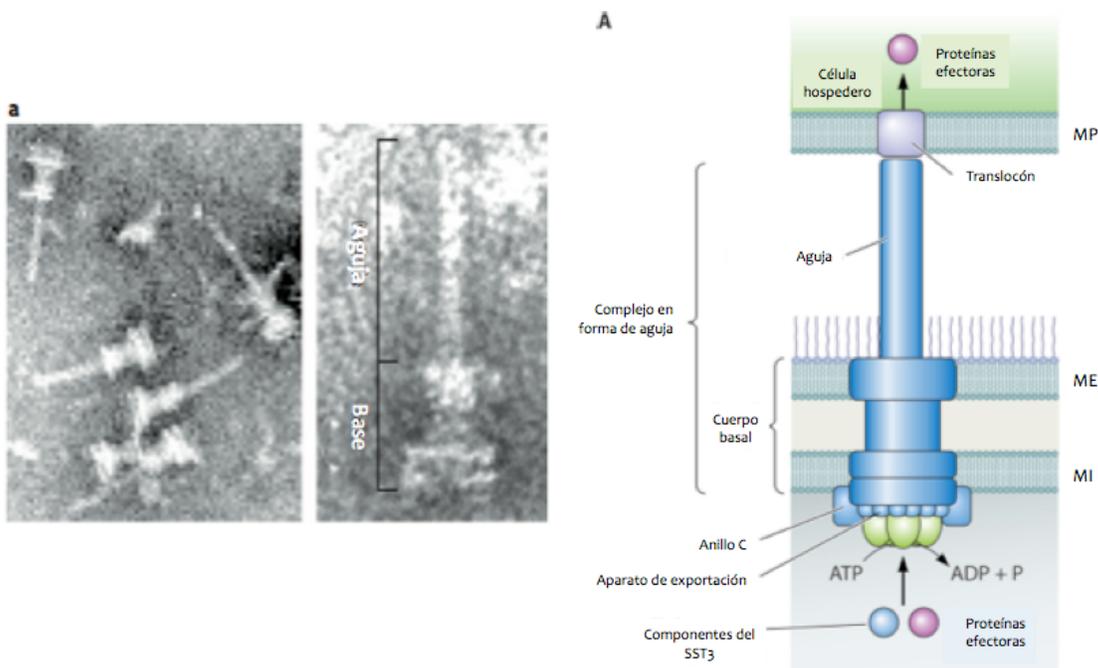
*S. enterica* y *bongori* tienen la capacidad de invadir células epiteliales, debido a la presencia de SPI-1, pero sólo *S. enterica* tiene la capacidad de diseminación sistémica, debido a la presencia de SPI-2 (Groisman y Ochman, 1997; Hensel, 2000).

### 3. Sistema de secreción tipo III (SST3)

Los SST3 son estructuras en forma de aguja compuestas de aproximadamente 20 proteínas, que median la transferencia de proteínas de virulencia de la bacteria, o proteínas efectoras, desde la bacteria hasta el citoplasma de la célula hospedero (Hansen-Wester y Hensel, 2001). Una vez dentro de la célula eucariota, estas proteínas efectoras son capaces de alterar las funciones celulares del hospedero, tales como la arquitectura del citoesqueleto, el tráfico a través de membranas, la transducción de señales y la expresión génica de las citocinas. Lo anterior con la finalidad de promover la supervivencia bacteriana y la colonización. Los SST3 se encuentran evolutivamente relacionados con el sistema de exportación flagelar y están presentes en múltiples bacterias patógenas Gram-negativas de humanos y animales. Mediante micrografía electrónica de SST3 purificados, se observa que la estructura en forma de aguja de estos complejos es hueca y consiste en una base de multi-anillos que se extiende desde la membrana interior hasta la membrana exterior de la envoltura bacteriana, mientras que una barra interior une los anillos (Kubori y Miller, 1998; Kimbrough y Miller, 2000). Otro conjunto de proteínas constituye el translocón, el cual se piensa está involucrado en la translocación de proteínas efectoras mediante la formación de un poro de translocación en la membrana celular del hospedero (Kimbrough y Miller, 2002) (Figura 2). Se ha mostrado que las proteínas efectoras contienen señales específicas blanco, localizadas en su extremo amino terminal que las orienta hacia el SST3 (Miao y Miller, 2000; Brumell *et al.*, 2003; Lee y Galán, 2004; Karavolos *et al.*, 2005). Además de esta señal para la secreción, muchos efectores poseen un sitio de unión para chaperonas específicas, cuya función se cree es estabilizar y dirigir a su sustrato afín hacia el aparato de translocación (Lee y Galán, 2004; Fu y Galán, 1998). La mayoría de las chaperonas son específicas para un solo efector, pero algunas pueden facilitar la secreción de más de una proteína efectora (Bronstein *et al.*, 2000; Tucker y Galán, 2000; Ehrbar *et al.*, 2003; Higashide y Zhou, 2006). Una ATPasa localizada en la base de la estructura en forma de aguja de estos complejos, no sólo dirige el

proceso de exportación, sino que también facilita la liberación de proteínas efectoras de las chaperonas, antes del transporte (Akeda y Galán, 2005) (Figura 2).

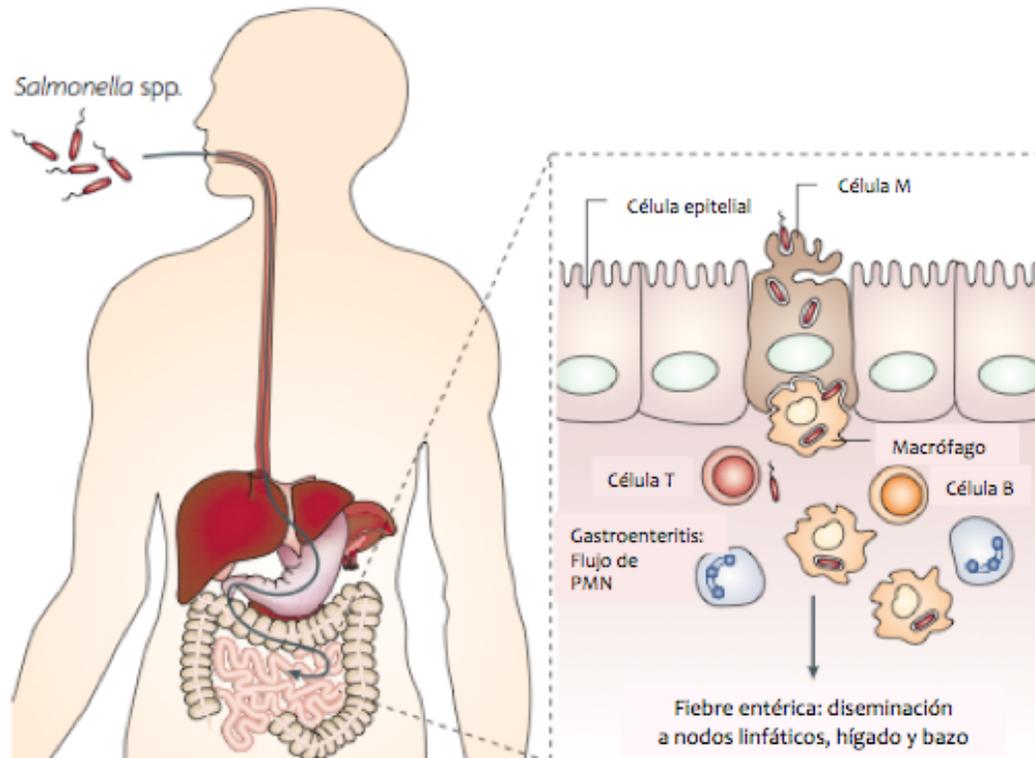
Por lo tanto, mientras que el SST3 codificado en SPI-1 se activa al contacto con las células epiteliales del intestino del hospedero, para translocar proteínas bacterianas a través de la membrana plasmática, el SST3 de SPI-2 se expresa dentro del fagosoma y transloca proteínas efectoras a través de la membrana vacuolar. Se ha visto que el sistema de SPI-1 se requiere para la invasión de células no fagocíticas, inducción de la respuesta intestinal inflamatoria, el establecimiento de la diarrea y la colonización del intestino. El SST3 de SPI2, por el contrario, tiene un importante papel en la supervivencia bacteriana dentro de macrófagos y en el establecimiento de la infección sistémica.



**Figura 2** (a: Kimbrough y Miller, 2000; A: Marlovits *et al.*, 2004). Estructura del SST3 de *Salmonella*. **a**. Micrografía electrónica de un complejo en forma de aguja purificado de *S. Typhimurium*. **A**. Representación esquemática de un SST3.

#### 4. Patogénesis de *Salmonella*

*Salmonella* se transmite por la vía oral-fecal. Las bacterias colonizan el intestino delgado e invaden células epiteliales no fagocíticas, logrando así el acceso a tejido linfático subyacente (Figura 3). La invasión está mediada por el SST3 codificado en SPI-1, ya que las proteínas que se translocan por medio de éste hacia la célula intestinal, provocan en ella una sucesión de cambios fisiológicos, entre los que inicialmente se encuentran modificaciones en el citoesqueleto de actina, permitiendo así la internalización de la bacteria a la célula hospedera. Después de la invasión de las células del epitelio intestinal, *Salmonella* puede diseminarse a cualquier tejido, ya que la bacteria es capaz de sobrevivir y propagarse dentro de macrófagos, un proceso que requiere del SST3 codificado en SPI-2. Las proteínas efectoras del SST3 de SPI-2 llevan a cabo una serie de funciones cuyo objetivo es permitir la replicación de *Salmonella* en vacuolas dentro del macrófago. Así, como ya se mencionó, los dos SST3, codificados en diferentes SPIs, tienen diferentes funciones en el proceso global de virulencia. Los genes de SPI-1 son necesarios para la invasión de *Salmonella* a los enterocitos, es decir, la colonización intestinal que origina los característicos síntomas de una enterocolitis. Los genes de SPI-2 permiten su replicación dentro de macrófagos y, por lo tanto, su diseminación sistémica, lo cual ocasiona fiebre tifoidea (Hansen-Wester y Hensel, 2001; Haraga *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha reportado que los genes de SPI-2 también tienen un papel importante en la infección intestinal (Coburn *et al.*, 2005; Coombes *et al.*, 2004; Hapfelmeier *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2007).



**Figura 3** (Haraga *et al.*, 2008). Biología de la infección por *Salmonella* en humano. *Salmonella*, adquirida por ingestión, sobrevive al bajo pH del estómago y evade las múltiples defensas del intestino delgado con la finalidad de abrirse paso al epitelio. *Salmonella* preferencialmente penetra por las células M, las cuales transportan a la bacteria a células linfoides (T y B) en los parches de Peyer subyacentes. Una vez que han atravesado el epitelio, los serotipos de *Salmonella* que están asociados con infección sistémica, entran a los macrófagos intestinales y se diseminan a través del sistema reticuloendotelial. Por el contrario, las especies de *Salmonella* no tifoidea, inducen una respuesta inflamatoria local temprana, lo cual resulta en la infiltración de PMNs (leucocitos polimorfonucleares) al lumen intestinal y en el origen de diarrea.

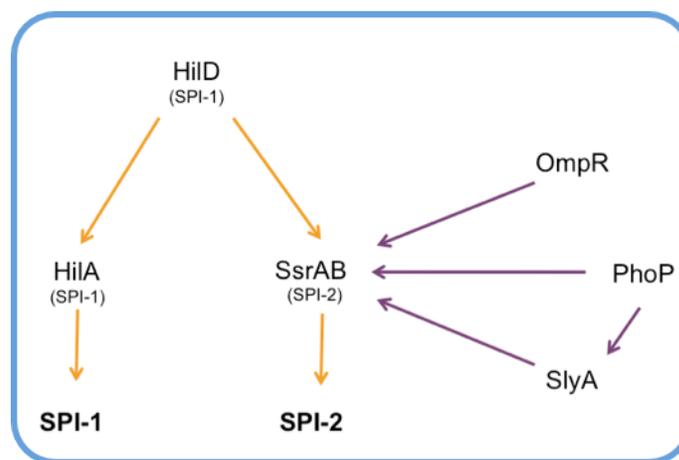
## 5. Cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2

La compleja interacción patógeno-hospedero debe ser controlada con precisión tal, que cada gen de virulencia de la bacteria sea expresado en el tiempo y lugar apropiado en el hospedero. Esto requiere de la integración de mecanismos de regulación que controlen la expresión de los genes en respuesta a estímulos ambientales.

SPI-1 codifica para los reguladores transcripcionales HilA, HilC, HilD e InvF (Altier, 2005; Jones, 2005; Ellermeier y Slauch, 2007). La expresión de los genes de SPI-1 se induce en cascada cuando HilD, un miembro de la familia AraC de reguladores transcripcionales, induce la expresión de HilA, que pertenece a la familia OmpR/ToxR. HilA entonces activa directamente la expresión de algunos genes de SPI-1, entre ellos el que codifica para InvF, un regulador, también miembro de la familia AraC, encargado de la activación del resto de genes de SPI-1 (Altier, 2005; Jones, 2005; Ellermeier y Slauch, 2007). Los genes de SPI-1 se expresan *in vivo*, cuando *Salmonella* se encuentra en el lumen intestinal del hospedador, e *in vitro*, cuando se crece a esta bacteria en el medio rico en nutrientes LB específicamente durante la transición de la fase exponencial de crecimiento a la fase estacionaria (Hansen-Wester y Hensel, 2001; Bustamante *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2011) (Figura 4).

SPI-2 codifica para el sistema de dos componentes SsrA/B, el cual induce directamente la expresión de todos los genes de SPI-2 (Fass y Groisman, 2009). *In vivo*, los genes de SPI-2 se expresan cuando *Salmonella* se encuentra en el lumen intestinal y cuando está dentro de las células hospederas, como en macrófagos (Hansen-Wester y Hensel, 2001; Brown *et al.*, 2005; Fass y Groisman, 2009). *In vitro*, estos genes se expresan en LB, en una fase estacionaria tardía, por un mecanismo dependiente del regulador HilD, codificado en SPI-1, así como en medios mínimos, con bajas concentraciones

de calcio, magnesio y potasio, por un mecanismo independiente de HilD, que involucra a los reguladores OmpR, PhoP y SlyA (Hansen-Wester y Hensel, 2001; Bustamante *et al.*, 2008; Fass y Groisman, 2009; Martínez *et al.*, 2011) (Figura 4).



**Figura 4.** Modelo general de la regulación de SPI-1 y SPI-2. La expresión de los genes de SPI-1 se induce en cascada cuando HilD induce la expresión de HilA, el cual activa la expresión de los genes de SPI-1. SPI-2 codifica para el sistema de dos componentes SsrA/B, el cual induce directamente la expresión de todos los genes de SPI-2. En flechas color naranja se muestra la regulación de SPI-1 y SPI-2, dependiente de HilD, mientras que en flechas color morado se muestra la regulación de SPI-2 independiente de HilD.

Un gran número de proteínas reguladoras, específicas de *Salmonella* y globales, han sido implicadas en la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, los cuales principalmente controlan la expresión de *hilD* (SPI-1) y *ssrAB* (SPI-2) (Altier, 2005; Jones, 2005; Ellermeier y Slouch, 2007; Fass y Groisman, 2009) (Tabla 2).

**Tabla 2** (Fabrega y Vila, 2013). Reguladores de SPI-1 y SPI-2 involucrados en la virulencia de *Salmonella*. (A, activación; R, represión).

Efecto sobre el determinante de virulencia		
Regulador	SPI-1	SPI-2
HilA	A	R
InvF	A	
HilD	A	A
HilC	A	
RtsA	A	
HilE	R	
SsrA-SsrB		A
PhoQ-PhoP	R/A	A
BarA-SirA	A	
RcsCDB	R	A
QseC-QseB	A	A
EnvZ-OmpR	A	A
PhoR-PhoB	R	
H-NS	R	R
Hha	R	R
YdgT		R
IHF	A	A
Fis	A	A
HU	A	A
FimWYZ	R	
FliZ	A	
RtsB	R	
Lrp	R	R
Lon	R	
DnaK	A	
Fur	A	
Mlc	A	
RNasa E	R	
FadD	A	
Pag	R	
SlyA		A

## 6. El sistema de dos componentes CpxRA

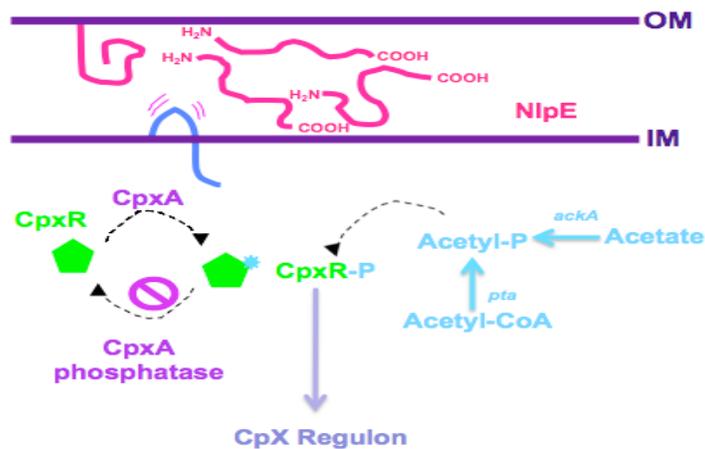
El sistema regulador de dos componentes CpxRA está compuesto por una histidina cinasa, CpxA, localizada en la membrana celular, y un regulador citoplásmico de respuesta, CpxR. En ausencia de las señales que activan al sistema, CpxA actúa como fosfatasa de CpxR, pero al detectar las señales correspondientes, CpxA se autofosforila y transfiere el grupo fosfato a un residuo aspártico conservado en CpxR. CpxR fosforilado (CpxR-P) posee la capacidad de unirse a DNA y regular la transcripción del regulón Cpx, compuesto por genes que codifican para factores involucrados en el plegamiento o degradación de proteínas de la envoltura celular, así como factores de virulencia. Entre los blancos que se encuentran bajo la regulación del sistema CpxRA, se hallan las proteínas DegP, una proteasa del periplasma que previene la acumulación de agregados proteicos; la disulfuro oxidasa DsbA, involucrada en el correcto plegamiento de proteínas del periplasma; Spy, proteína de estrés periplásmico y PpiA y PpiD, dos peptidil-prolil isomerasas (Raivio, 2005; Zahrl *et al.*, 2006; Nevesinjac y Raivio, 2005).

El sistema CpxRA se activa por alteraciones en la composición de la envoltura celular, ocasionadas por cambios en el pH, la temperatura, estrés oxidante, cambios en la osmolaridad, la presencia de proteínas mal plegadas en el periplasma, contacto con superficies abióticas, ensamblaje del pili o sistemas de secreción, ó presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , indol, EDTA, etanol y antibióticos (Jones *et al.*, 1997; Danese y Silhavy, 1998; Prigent *et al.*, 2001; Kershaw *et al.*, 2005; Zahrl *et al.*, 2006).

En estudios de laboratorio, el sistema CpxRA se activa al sobre-expresar la lipoproteína NlpE. La sobre-expresión de CpxR también activa el regulón Cpx, ya que en altas concentraciones, CpxR puede actuar independientemente de su estado de fosforilación. CpxR puede ser fosforilada también por acetil-fosfato; así, en ausencia de CpxA (y por lo tanto de su actividad de fosfatasa de CpxR)

se puede acumular CpxR-P, que se fosforila por acetil fosfato (Figura 5) (Raivio, 2005).

Se ha reportado que la expresión y el ensamblaje de estructuras localizadas en la envoltura celular, tal como el pili P y el pili tipo IV de *E. coli*, generan respuestas de estrés extracitoplásmico que activan al sistema CpxRA y así se controla la biogénesis de estos pilis (Zahrl *et al.*, 2006; Nevesinjac y Raivio, 2005). Así mismo, se ha demostrado que, en ausencia de este sistema de dos componentes, la síntesis de proteínas involucradas en la formación del pili P (DegP y DsbA), se ve disminuida y se altera significativamente la adherencia de las bacterias a células epiteliales (Nevesinjac y Raivio, 2005). De esta manera, CpxRA puede controlar tanto la expresión como la biogénesis de diferentes tipos de pili.

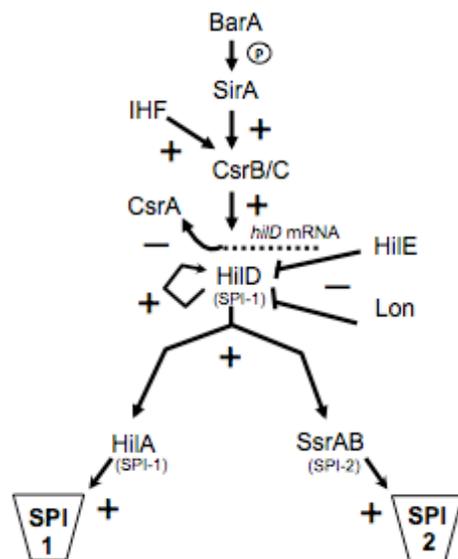


**Figura 5** (Snyder *et al.*, 1995; Danese y Silhavy, 1997). El sistema regulador de dos componentes CpxRA (Raivio, 2005). La histidina cinasa sensora, CpxA, localizada en la membrana interna bacteriana, se autofosforila en respuesta a señales de estrés en la envoltura celular, que originan estrés y por lo tanto mal plegamiento de proteínas del periplasma. Una vez fosforilada, CpxA transfiere el grupo fosfato a CpxR (CpxR-P), su regulador citoplásmico de respuesta. CpxR-P regula a sus genes blanco al unirse directamente a una secuencia conservada en la región reguladora de los mismos. Alternativamente, CpxR puede fosforilarse por acetil-fosfato (acetil-P), generado endógenamente en la bacteria, a partir de acetato mediante la acetato cinasa (*ackA*) y a partir de acetil-CoA mediante la fosfotransacetilasa (*pta*). En ausencia de señal, CpxA actúa como fosfatasa de CpxR, previniendo así la acumulación de CpxR-P generado por acetil-P.

### III. ANTECEDENTES

Con recientes resultados de nuestro grupo y previos resultados de otros grupos, se ha integrado una cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 (Figura 6) (Bustamante *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2011; Bustamante *et al.*, datos no publicados). En dicha cascada de regulación, el sistema de dos componentes SirA/BarA induce directamente la expresión de CsrB y CsrC, dos moléculas de RNA que unen y secuestran a CsrA, antagonizando su acción represora sobre la expresión de HilD. CsrA es una proteína de unión a RNA que regula negativamente la expresión de *hilD* a nivel pos-transcripcional, uniéndose a su secuencia de unión a ribosomas (Shine-Dalgarno) y a su codón de inicio de la traducción (Baker *et al.*, 2002; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008; Timmermans y Van Melderen, 2010; Martínez *et al.*, 2011). La apropiada concentración y actividad de HilD es mantenida por mecanismos regulatorios positivos y negativos adicionales, incluyendo su autorregulación positiva, su degradación por la proteasa Lon (Boddicker y Jones, 2004; Takaya *et al.*, 2005) y su inactivación por interacción directa con HilE (Olekhovich y Kadner, 2002; Baxter *et al.*, 2003; Ellermeier *et al.*, 2005; Takaya *et al.*, 2005). La cascada regulatoria diverge cuando HilD induce de manera consecutiva la expresión de *hilA* y del operón *ssrAB*, los cuales codifican para HilA y el sistema de dos componentes SsrA/B, los reguladores positivos centrales de los regulones de SPI-1 y SPI-2, respectivamente (Ellermeier y Slauch, 2007; Bustamante *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2011) (Tabla 3). Se propone que esta cascada de regulación puede ser activada por ácidos grasos de cadena corta, tales como el acetato, el formiato o el propionato, los cuales estimulan la actividad de la cinasa BarA, induciendo su auto-fosforilación y, como consecuencia, la fosforilación de SirA mediada por BarA (Chávez *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2011). Alternativamente, el acetil-fosfato puede fosforilar directamente el regulador de respuesta SirA o la cinasa sensora BarA (Altier *et al.*, 2000; Lawhon *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2011). El acetil-fosfato puede ser generado a partir de acetato, el cual es comúnmente encontrado en la parte

distal del íleon en los intestinos de mamíferos. Dentro de la bacteria el acetato es convertido a acetil-fosfato mediante la acetato cinasa (*ackA*) y, probablemente también puede ser producido de manera endógena a partir de Acetil-CoA mediante fosfotransacetilasas (*pta*) (Figura 5) (Lawhon *et al.*, 2002; Teplitski *et al.*, 2006). Así, SirA fosforilada activa directamente la expresión de *csrB* y *csrC* (Martínez *et al.*, 2011). Ortólogos de SirA/BarA están presentes en *Escherichia coli* (UvrY/BarA), las especies de *Pseudomonas* (GacA/GacS), *Vibrio cholerae* (VarA/VarS), *Erwinia carotovora* (ExpA/ExpS) y *Legionella pneumoniae* (LetA/LetS), donde controlan la expresión de los genes asociados con la virulencia, metabolismo secundario, motilidad, producción de exoenzimas, *quorum sensing* y formación de biofilm (Goodier y Ahmer, 2001; Lapouge *et al.*, 2008).



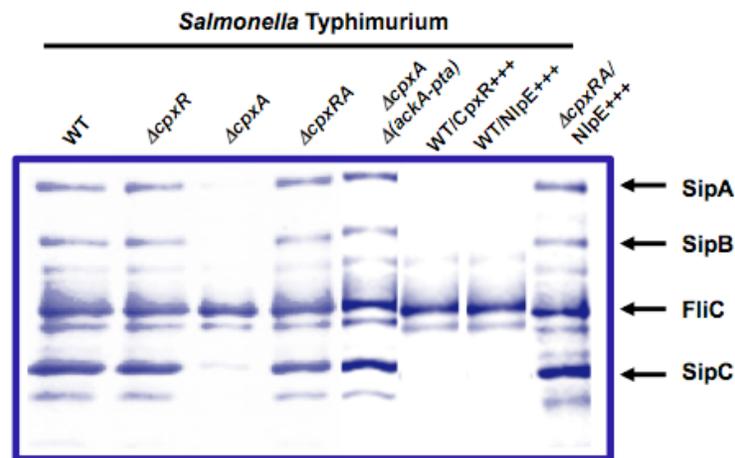
**Figura 6** (Bustamante *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2011). Cascada de regulación de los genes de SPI-1 y SPI-2.

**Tabla 3** (Martínez *et al.*, 2011). Breve descripción de la función de los reguladores involucrados en la cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2.

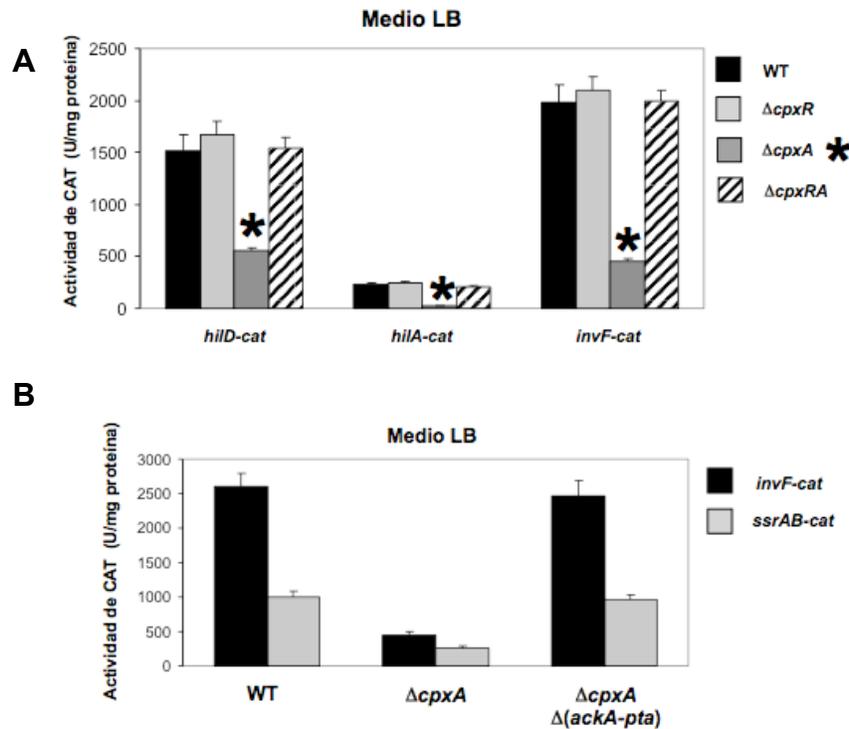
Regulador	Función
<b>BarA / SirA</b>	Sistema de dos componentes, se activa por ácidos grasos de cadena corta. SirA es el regulador transcripcional global que regula positivamente la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2.
<b>IHF</b>	Proteína de unión e inductora del doblamiento de DNA. Regula positivamente la expresión de <i>csrB</i> y <i>hilA</i> .
<b>CsrB CsrC</b>	Dos pequeñas moléculas de RNA no codificante, cada una contiene varios motivos que son reconocidos por la proteína de unión a RNA, CsrA.
<b>CsrA</b>	Proteína homodimérica que se une a secuencias que sobrelapan la secuencia Shine-Dalgarno en RNAm blanco, bloqueando la unión del ribosoma y la traducción, promoviendo la degradación del RNAm.
<b>HilD</b>	Regulador central de los genes de SPI-1 y SPI-2. Está codificado en SPI-1.
<b>HilE</b>	La proteína HilE inactiva a HilD mediante interacción directa.
<b>Lon</b>	Proteasa que degrada a HilD
<b>HilA</b>	La proteína reguladora HilA se codifica en SPI-1. La inducción de HilA activa la expresión de los genes de SPI-1.
<b>SsrAB</b>	Sistema de dos componentes, regulador central de los genes de SPI-2.

Varios otros reguladores han sido implicados en la regulación de los genes de SPI-1 (Altier, 2005; Jones, 2005; Ellermeier y Slauch, 2007). En la mayoría de los casos se ha visto que afectan la expresión de HilA, como sucede con los reguladores IHF y el sistema de dos componentes CpxRA. Recientemente en nuestro grupo se determinó que IHF regula de manera directa la expresión de CsrB, regulador localizado corriente arriba de HilD en la cascada de regulación de los genes de SPI-1 y SPI-2 (Figura 6) (Martínez *et al.*, datos no publicados). Así, IHF regula de manera indirecta la expresión, tanto de los genes de SPI-1, como la de los genes de SPI-2. Por otro lado, también se ha determinado que, en condiciones donde se acumula CpxR-P, como en una mutante  $\Delta cpxA$  (debido a la ausencia de la actividad de fosfatasa de CpxA), o cuando se sobre-expresa la lipoproteína NlpE, o se sobre-expresa CpxR, se reprime la secreción de proteínas de SPI-1 (Figura 7) y la expresión de *hilA* y *hilD* (Figura 8A) (Nakayama *et al.*, 2003; De la Cruz *et al.*, datos no publicados). Con base en

estos resultados nuestro grupo propone que CpxR-P reprime la expresión de *hilD*, lo cual, en consecuencia, reduce la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2. Sin embargo, queda aún por definir si CpxR-P regula directamente la expresión de *hilD*, o lo hace indirectamente, posiblemente al controlar la expresión de algunos de los reguladores que afectan la concentración de HilD, como SirA/BarA, CsrA/B/C, Lon o HilE (Figura 6).



**Figura 7** (De la Cruz, datos no publicados). CpxR reprime la secreción de proteínas codificadas en SPI-1. La secreción de las proteínas SipA, SipB y SipC, codificadas en SPI-1, se analizó en diferentes fondos genéticos en *S. Typhimurium*: cepa silvestre (WT), en ausencia de CpxR ( $\Delta cpxR$ ), en ausencia de CpxA ( $\Delta cpxA$ ), en ausencia de CpxR y CpxA ( $\Delta cpxRA$ ), en ausencia de CpxA y acetil fosfato ( $\Delta cpxA \Delta[ackA-ptb]$ ), en la sobreexpresión de CpxR (WT/CpxR<sup>+++</sup>), sobre-expresando la lipoproteína NlpE (WT/NlpE<sup>+++</sup>) y, en la ausencia de CpxRA con la sobre-expresión de NlpE ( $\Delta cpxRA/NlpE^{+++}$ ). La acumulación de CpxR-P- generado en  $\Delta cpxA$  por acción de acetil fosfato, o en WT/NlpE<sup>+++</sup>, mediante la activación de CpxA, o la sobre-expresión de CpxR (CpxR en elevadas concentraciones puede actuar sobre sus genes blanco, independientemente de su estado de fosforilación)- reprime la secreción de las proteínas SipA, SipB y SipC, y no así, la secreción de la proteína flagelar FliC, la cual no está sujeta a la regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1.



**Figura 8** (De la Cruz, datos no publicados). CpxRA reprime la expresión de *hilD*, regulando negativamente así, de manera indirecta, la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2. (A) Mediante fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, se evaluó la expresión de los genes *hilD*, *hilA* e *invF* (codificado en SPI-1) en cuatro diferentes fondos genéticos en *S. Typhimurium*: cepa silvestre (WT), en ausencia de CpxR ( $\Delta cpxR$ ), en ausencia de CpxA ( $\Delta cpxA$ ) y en ausencia de CpxR y CpxA ( $\Delta cpxRA$ ). Se observa que en la mutante  $\Delta cpxA$ , en donde se acumula CpxR-P generado por acción de acetil fosfato, se reprime la expresión de los genes *hilD*, *hilA* e *invF*. Dado que HilD es el regulador positivo tanto de SPI-1 como de SPI-2, estos resultados sugieren que el sistema CpxRA reprime la expresión tanto de los genes de SPI-1 como de SPI-2, a través de la regulación negativa que ejerce sobre *hilD*. (B) Mediante fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, se evaluó la expresión de *invF* y el sistema *ssrAB* (regulador central de los genes de SPI-2) en tres diferentes fondos genéticos en *S. Typhimurium*: WT,  $\Delta cpxA$  y  $\Delta cpxA \Delta(ackA-pta)$ . Se observa que en la mutante  $\Delta cpxA$  se reprime la expresión de los genes *invF* y *ssrAB*, mientras que en la doble mutante  $\Delta cpxA \Delta(ackA-pta)$  la expresión de estos genes se restaura. Estos resultados sugieren fuertemente que CpxR-P es quien reprime la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2.

En un estudio realizado en *E. coli*, se reportó que CpxR-P estimula la transcripción del factor  $\sigma^{32}$  (RpoH) (Zahrl *et al.*, 2006). Mediante el método de extensión de *primer*, se analizó la abundancia de los transcritos originados a partir del promotor  $p_1$  de *rpoH* en una cepa silvestre y en su derivada mutante  $\Delta cpxR$ . Los resultados mostraron que se redujo aproximadamente a la mitad la actividad de este promotor en la mutante  $\Delta cpxR$ , indicando que CpxR regula positivamente la expresión de *rpoH* (Zahrl *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha reportado que en *S. Typhimurium*, RpoH reprime la expresión de HilD a través de Lon (proteasa que degrada a HilD) (Matsui *et al.*, 2008). Lo anterior se dedujo al determinar el nivel de HilD, mediante Western Blot, en la cepa silvestre que contiene un plásmido que expresa a RpoH bajo el promotor fuerte  $P_{Al/lacO-1}$ . Se mostró que la sobre-producción de  $\sigma^{32}$  resultaba en un marcado descenso en el nivel celular de HilD. En contraste, la sobre-producción de  $\sigma^{32}$  no afectó la concentración de HilD en una mutante  $\Delta lon$ , sugiriendo que  $\sigma^{32}$  controla el nivel celular de HilD a través de la inducción de la proteasa Lon (Matsui *et al.*, 2008).

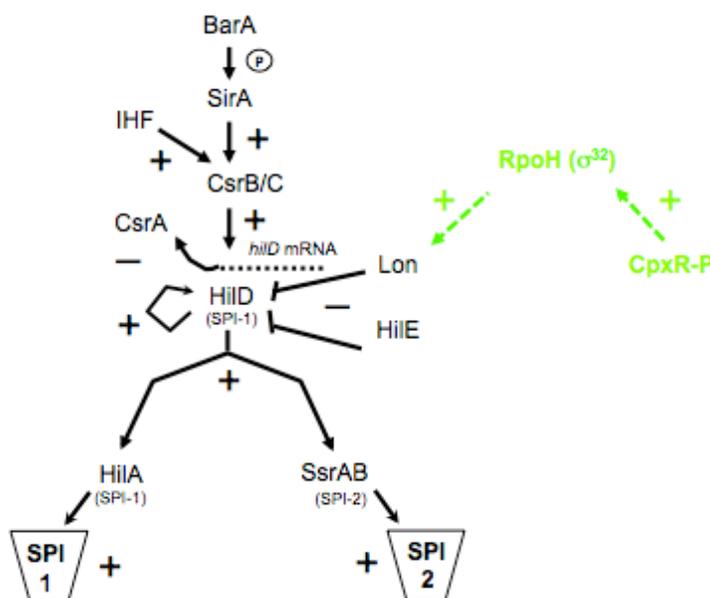
Así mismo, resultados obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que CpxR-P actúa a través de Lon para reprimir a los genes de SPI-1 y SPI-2 (De la Cruz *et al.*, datos no mostrados).

En conjunto, todos estos antecedentes sugieren que en *S. Typhimurium*, CpxR-P podría inducir la expresión de RpoH, que a su vez induciría la expresión de la proteasa Lon, la cual degrada a HilD y, por lo tanto, esto causaría la disminución de la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 (Figura 9). Sin embargo, falta aún definir con precisión esta posible cascada de regulación; por ejemplo, determinar si CpxR-P requiere a Lon y a RpoH para reprimir a los genes de SPI-1 y SPI-2, si CpxRA regula directa o indirectamente la expresión de *rpoH*, y si RpoH regula la expresión de *lon*. Además, no se puede descartar por completo un efecto de CpxRA sobre la expresión de *hilD*

por una vía adicional. El presente proyecto tiene como objetivo principal definir el mecanismo por medio del cual CpxR-P reprime la expresión de *hilD*, con lo cual se afecta la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2.

#### IV. HIPÓTESIS

CpxR disminuye la concentración de HilD, y por lo tanto, reprime la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, actuando en cascada, al inducir directamente la expresión de RpoH, que a su vez incrementa la expresión de Lon, proteasa que degrada a HilD (Figura 9).



**Figura 9.** En verde, hipótesis del mecanismo por medio del cual CpxR-P reprime la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, en donde CpxR disminuye la concentración de HilD, y por lo tanto, reprime la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, actuando en cascada, al inducir directamente la expresión de RpoH, que a su vez incrementa la expresión de Lon, proteasa que degrada a HilD.

## V. OBJETIVOS

### 1. Objetivo general

Determinar los mecanismos moleculares por medio de los cuales el sistema de dos componentes CpxR/A regula la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 en *Salmonella Typhimurium*.

### 1. Objetivos específicos

- a) Determinar el efecto de CpxRA en la expresión de *hilD*, *hilA*, *rpoH*, *lon*, *csrB/C/A* y *hilE*.
- b) Definir los blancos directos de CpxRA para la regulación de los genes de SPI-1 y SPI-2.
- c) Identificar la secuencia a la cual se une CpxR para regular a los genes de SPI-1 y SPI-2.
- d) Construir una mutante de *S. Typhimurium* en la que los genes de SPI-1 y SPI-2 ya no se afecten por CpxRA.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Las cepas y plásmidos utilizados en este estudio se enlistan en la Tabla 4. Los cultivos bacterianos se crecieron a 37°C en medio LB (10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl por litro, pH ajustado a 7.5 con NaOH), o en medio mínimo N (MM-N) (KCl 5 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7.5 mM, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, Tris-HCl (pH 7.5) 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 μM, glicerol 0.5% y casaminoácidos 0.1%). Cuando fue necesario, los medios fueron suplementados con antibióticos: ampicilina (100 μg/ml), tetraciclina (10 μg/ml), kanamicina (25 μg/ml). Para probar el efecto de baja osmolaridad, se usó LB hecho con 1 g de NaCl en lugar de 10g; para probar el efecto del pH ácido, al LB normal se le añadió amortiguador MES 100mM y se ajustó el pH a 5.0 con HCl; para probar el efecto del pH alcalino, al LB normal se le añadió amortiguador Tris-HCl 100mM y se ajustó el pH a 8.5 con NaOH; y para probar el efecto de alta temperatura, los cultivos se crecieron a 42°C en LB normal.

### 2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología-UNAM, se enlistan en la Tabla 5. Todos los oligonucleótidos se diluyeron a una concentración final de 25 μM antes de utilizarlos.

Tabla 4. Cepas y plásmidos empleados en este estudio.

CEPAS	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
<i>S. Typhimurium</i> 14028	Cepa silvestre 14028	ATCC
<i>S. Typhimurium</i> $\Delta cpxA::Km$	Derivada de 14028, a la cual se le removió <i>cpxA</i> ; Km <sup>R</sup>	De la Cruz M.A., datos no publicados
<i>S. Typhimurium</i> $\Delta lon::$	Derivada de <i>S. Typhimurium</i> $\Delta lon::Km$ , a la cual se le eliminó el casete de Km	De la Cruz M.A., datos no publicados
<i>S. Typhimurium</i> <i>rpoH</i> $\Delta$ CpxR-BS::Km	Derivada de 14028; a la cual se le eliminó el sitio de reconocimiento predicho de CpxR en la región reguladora de <i>rpoH</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
<i>S. Typhimurium</i> <i>rpoH</i> $\Delta$ CpxR-BS::	Derivada de <i>S. Typhimurium</i> <i>rpoH</i> $\Delta$ CpxR-BS::Km; a la cual se le removió el casete de Km	Este trabajo
<i>S. Typhimurium</i> <i>lon</i> -FLAG::Km	Derivada de 14028; a la cual se le fusionó la secuencia que codifica para FLAG al gen <i>lon</i> ; Km <sup>R</sup>	Este trabajo
<i>S. Typhimurium</i> <i>lon</i> -FLAG::	Derivada de <i>S. Typhimurium</i> <i>lon</i> -FLAG::Km, a la cual se le eliminó el casete de Km	Este trabajo
<i>E. coli</i> DH10 $\beta$	Cepa de laboratorio; Str <sup>R</sup>	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 pCA- <i>cpxR</i>	F <sup>-</sup> araD139 $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> ) U169 <i>rpsL150 relA1 flbb5301 deoC1 ptsF25 rbsR::Ap<sup>R</sup></i>	Stratagene
PLÁSMIDOS	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pKK232-8	Derivado del pBR322 que contiene el gen <i>cat</i> (cloranfenicol acetil transferasa) sin promotor, empleado para la construcción de fusiones transcripcionales; Ap <sup>R</sup> .	Pharmacia Biot
prpoH-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>rpoH</i> - <i>cat</i> , que lleva la región -574 a +27 respecto al inicio de transcripción de <i>rpoH</i>	De la Cruz M.A., datos no publicados
prpoH $\Delta$ CpxR-BS-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>rpoH</i> $\Delta$ CB- <i>cat</i> , que lleva la región reguladora de <i>rpoH</i> sin la secuencia de unión predicha de CpxR	Este trabajo
plon-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>lon</i> - <i>cat</i> , que lleva la región -296 a +61 respecto al inicio de transcripción de <i>lon</i>	Este trabajo
pclpX-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>clpX</i> - <i>cat</i> , que lleva la región -330 a +76 respecto al inicio de transcripción de <i>clpX</i>	Este trabajo
pclpP-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>clpP</i> - <i>cat</i> , que lleva la región -335 a +57 respecto al inicio de transcripción de <i>clpP</i>	Este trabajo
philE-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilE</i> - <i>cat</i> , que lleva la región -910 a +50 respecto al inicio de transcripción de <i>hilE</i>	De la Cruz M.A., datos no publicados
pcsrA-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrA</i> - <i>cat</i> , que lleva la región -320 a +60 respecto al inicio de transcripción de <i>csrA</i>	Martínez, L.C., datos no publicados
pcsrB-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrB</i> - <i>cat</i> , que lleva la región -372 a +18 respecto al inicio de transcripción de <i>csrB</i>	Martínez <i>et al.</i> , 2012
pcsrC-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrC</i> - <i>cat</i> , que lleva la región -351 a +63	Martínez <i>et al.</i> , 2012

	respecto al inicio de transcripción de <i>csrC</i>	
<b>phiD-cat</b>	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilD-cat</i> , que lleva la región -364 a +88 respecto al inicio de transcripción de <i>hilD</i>	Bustamante <i>et al.</i> ,
<b>phiD-cat-108</b>	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilD-cat</i> , que lleva la región -108 a +88 respecto al inicio de transcripción de <i>hilD</i>	Bustamante V.H., d publicados
<b>phiD-cat-48</b>	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilD-cat</i> , que lleva la región -48 a +88 respecto al inicio de transcripción de <i>hilD</i>	Bustamante V.H., d publicados
<b>phiA-cat</b>	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilA-cat</i> , que lleva la región -410 a +446 respecto al inicio de transcripción de <i>hilA</i>	Bustamante <i>et al.</i> ,
<b>pinvF-cat</b>	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>invF-cat</i> , que lleva la región -306 a +213 respecto al inicio de transcripción de <i>invF</i>	Bustamante <i>et al.</i> ,
<b>pMPM-K3</b>	Vector de clonación de bajo número de copia derivado del p15A; contiene el promotor <i>lac</i> ; Km <sup>R</sup>	Mayer, M.P., 19
<b>pK3-CpxR</b>	Derivado de pMPM-K3; contiene el gen estructural <i>cpxR</i> con su sitio de unión a ribosomas, bajo el control del promotor <i>lac</i> del vector	Este trabajo
<b>pCA-CpxR</b>	Derivado de pCA24N; expresa a la proteína CpxR con una fusión de 6 histidinas en su extremo amino terminal	Kitagawa <i>et al.</i> , 2
<b>pK3-RpoH</b>	Derivado de pMPM-K3; contiene el gen estructural <i>rpoH</i> con su sitio de unión a ribosomas, bajo el control del promotor <i>lac</i> del vector	Bustamante V.H., d publicados
<b>pKD4</b>	Derivado de pANTSy; contiene el gen de resistencia a Km, flanqueado por FRTs.	Datsenko y Wanner
<b>pKD46</b>	Derivado de pINT-ts, contiene el sistema de recombinación del fago λRojo, bajo el control de un promotor inducible por arabinosa; Amp <sup>R</sup> .	Datsenko y Wanner
<b>pCP20</b>	Plásmido de replicación termo-sensible e inducción térmica de la síntesis de la recombinasa FLP.	Cherepanov y Wackern
<b>pSUB11</b>	Derivado de pGP704, contiene el gen de resistencia a Km y la secuencia completa del epítotope 3XFLAG.	Uzzau <i>et al.</i> , 20

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en este estudio

O	SECUENCIA	CARACTERÍSTICAS	USO
lv 1 (H)	5' -CAG <u>GGA TCC</u> CGT CAA CCA GAA GAT GGC G-3'	Sitio de restricción para <i>Bam</i> HI (secuencia subrayada)	Clonar el gen <i>cpxR</i>
w 1	5' -TGA <u>AAG CTT</u> TTT CTG CCT CGG AGG TAC G-3'	Sitio de restricción para <i>Hind</i> III (secuencia subrayada)	
Fwd 1	5'-GTC <u>GGA TCC</u> TGC CGG TCA GAG TAA GCC G-3'	Sitio de restricción para <i>Bam</i> HI (secuencia subrayada)	Construir la fusión <i>lon</i> · <i>ca</i>
Rv1	5'-TAC <u>AAG CTT</u> GGG TAT GAC CAT GTG CGG-3'	Sitio de restricción para <i>Hind</i> III (secuencia subrayada)	
Bam	5'-GAT <u>GGA TCC</u> TAT GCG TAA CGT CGC TCT GG-3'	Sitio de restricción para <i>Bam</i> HI (secuencia subrayada)	Construir la fusión <i>clpP</i> · <i>ca</i>
Hind	5'-GAG <u>AAG CTT</u> TAT CAA AAG AGC GCT CAC CG-3'	Sitio de restricción para <i>Hind</i> III (secuencia subrayada)	
Bam	5'-TCA <u>GGA TCC</u> TGA GCA GAT TGA ACG TGA TAC-3'	Sitio de restricción para <i>Bam</i> HI (secuencia subrayada)	Construir la fusión <i>clpX</i> · <i>ca</i>
Hind	5'-GAA <u>AGC TTC</u> GGA TGG ACC GGC AAT CAG-3'	Sitio de restricción para <i>Hind</i> III (secuencia subrayada)	
Hind	5'-TAT <u>AAG ATT</u> CCA GGT TGC CAA CAG GGG C-3'	Sitio de restricción para <i>Hind</i> III (secuencia subrayada)	Construir la fusión <i>rpoHΔCpxR</i> -f Verificar la construcción de las <i>α</i> Typhimurium <i>rpoHΔcpxR</i> -BS::K Typhimurium <i>rpoHΔcpxR</i> -B Amplificar la región reguladora de realizar EMSA
Bam	5'-GGG <u>GAT CCT</u> CGT TAT CGG CAA CAG CG -3'	Sitio de restricción para <i>Bam</i> HI (secuencia subrayada)	
nHI-5'	5'- CAT <u>GGA TCC</u> ACG TCG CGC AG-3'	Sitio de restricción para <i>Bam</i> HI (secuencia subrayada)	Amplificar la región reguladora de realizar EMSA
dIII-3'	5'-AAG TAA <u>GCT TTC</u> GGT CAT CAT C -3'	Sitio de restricción para <i>Hind</i> III (secuencia subrayada)	
HindIII	5'-TTC <u>AAG CTT</u> CGA CTC CCT GTC GAC GAAG-3'	Sitio de restricción para <i>Hind</i> III (secuencia subrayada)	Amplificar la región reguladora de realizar EMSA
nHI	5'- CAA <u>GGA TCC</u> TCC CAC GCT TTT TAT TGC G-3'	Sitio de restricción para <i>Bam</i> HI (secuencia subrayada)	
Rv1	5' -CCT <u>GAA GCT</u> TCG CCT CCT GGC GCT CC-3'	Sitio de restricción para <i>Hind</i> III (secuencia subrayada)	Amplificar la región reguladora de realizar EMSA
Fw1	5'-CTT <u>CGG ATC</u> CGC AAT CGG AAG GTA AAT GG-3'	Sitio de restricción para <i>Bam</i> HI (secuencia subrayada)	

rv2	5'-CCT <u>AAA GCT TTC</u> ACG GTG ACC TCA TCG CC-3'	Sitio de restricción para <i>HindIII</i> (secuencia subrayada)	Para amplificar la región reguladora y realizar EMSA
rw2	5'-GCG <u>GGG ATC CGG</u> ACA TGG CGC AAG CC-3'	Sitio de restricción para <i>BamHI</i> (secuencia subrayada)	
G-F	5'-TCT GCA AAA CGA ACC GTC TGG AAT GCA GGT TGT AAC CGC AAA <b>AGA CTA CAA AGA CCA TGA CCG T</b> -3'	FLAG; secuencia en rojo: región que hibridará con pSUB11; secuencia en negrillas: secuencia homóloga a la región adyacente al codón de paro del gen a etiquetar.	Etiquetar <i>lon</i> con el epítipo F
-R	5'-TGC CAG CCC TGT TTT TAT TAG CGC TAT TTG CGC GAG GCA TAT GAA TAT CCT CCT TAG TTC-3'	FLAG; secuencia en rojo: región que hibridará con pSUB11; secuencia en negrillas: secuencia homóloga a la región adyacente al codón de paro del gen a etiquetar.	
ind)	5'-CAC <u>AAG CTT</u> ACA ACA CCC GT-3'	Sitio de restricción para <i>HindIII</i> (secuencia subrayada)	Para verificar la construcción <i>lon</i>
Kpn)	5'-GGT <u>GGT ACC</u> GAG CAC AGC TA-3'	Sitio de restricción para <i>KpnI</i> (secuencia subrayada)	
(H1P1)	5'- <b>CCC ATT GCA GGG AAA GAT TAT ACC ACG ATT TTA TCA ATC GGG</b> TGT <b>AGG CTG GAG CTG CTT CG</b> -3'	Mutagénesis; secuencia en rojo: nucleótidos homólogos a la secuencia que flanquea el casete de Km en el plásmido pKD4; secuencia en negrillas: nucleótidos homólogos a la región que flanquea a la secuencia que se desea remover	Mutar la secuencia que reconoce la región reguladora de <i>rpo</i>
(H2P2)	5'- <b>ATG ATT GGC TGG ATC GCC GCC TGG CTG GCC ACG GTG CAA CAC ATA TGA ATA TCC TCG</b> TTA G-3'	Mutagénesis; secuencia en rojo: nucleótidos homólogos a la secuencia que flanquea el casete de Km en el plásmido pKD4; secuencia en negrillas: nucleótidos homólogos a la región que flanquea a la secuencia que se desea remover	
	5' -CAG TCA TAG CCG AAT AGC CTC-3'	Nucleótidos homólogos a la secuencia que flanquea el casete de Km proveniente del plásmido pKD4	Verificación del proceso de mutagenesis y verificación de la remoción del casete de Km en nuevas mutantes
	5' -CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC-3'	Nucleótidos homólogos a la secuencia que flanquea el casete de Km proveniente del plásmido pKD4	

### 3. Construcción de fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*

Para la construcción de las fusiones transcripcionales *lon-cat*, *clpX-cat* y *clpP-cat*, se emplearon los oligonucleótidos prom *lon* Fwd1/prom *lon* Rv1, pClpX-Hind/pClpX-Bam y pClpXP-Hind/pClpXP-Bam, respectivamente (Tabla 5), con los cuales se realizó PCR, utilizando como molde DNA genómico de la cepa *S. Typhimurium* 14028.

Condiciones de PCR:

Temperatura (° C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
94	5	1 ciclo
94	1	30 ciclos
55	1	
70	1	
70	3	1 ciclo

Una vez obtenido el producto de PCR, se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa; se verificó, mediante el peso molecular, que la banda correspondiera con el producto deseado y se encontrara libre de contaminación. Posteriormente se realizó el protocolo de extracción de DNA de gel con el estuche comercial “AxyPrep DNA Gel Extraction Kit” (DNA Gel Extraction Spin Protocol) de Axygen.

Se llevó a cabo la purificación del vector pKK232-8 (Tabla 4), un plásmido que contiene al gen reportero *cat* sin promotor (Amersham Pharmacia LKB Biotechnology), empleando el estuche comercial “AxyPrep Plasmid Miniprep Kit” (AxyPrep Plasmid Miniprep Spin Protocol) de Axygen y fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, respectivamente.

Los productos de PCR se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, respectivamente, cuyos sitios de corte están contenidos dentro de los oligonucleótidos con los que se realizó la PCR.

La digestión, tanto del plásmido, como del producto de PCR, se llevó a cabo de la manera siguiente:

<b>Mezcla de reacción</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>μL</b>
Amortiguador de enzima	10
Enzima	2
DNA	*
H <sub>2</sub> O	cbp
Volumen final	100

\* El volumen de DNA a añadir, tanto de inserto como de vector, se determina a partir de electroforesis en gel de agarosa, depende de la intensidad y tamaño de la banda obtenida.

La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas a 37°C, posteriormente el DNA se limpió de los componentes de la reacción con el estuche comercial “AxyPrep PCR Cleanup Kit” (PCR clean-up spin protocol) de Axygen. Se verificó la digestión del vector mediante electroforesis en gel de agarosa y se procedió a la digestión con la segunda enzima, incubándose durante 2 horas a 37 °C.

Se limpió el DNA de cada digestión con el estuche comercial “AxyPrep PCR Cleanup Kit” (PCR clean-up spin protocol) y se evaluó la integridad de los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa.

La ligación del inserto con el vector se llevó a cabo de la manera siguiente:

<b>Mezcla de reacción</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>μL</b>
Vector	5
Inserto	10
Amortiguador de enzima	2
Enzima ligasa	1
Agua	cbp
Volumen final	20

La reacción se incubó a 16° C durante toda la noche. Al día siguiente, se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Con la finalidad de precipitar el DNA, se añadió 1 μL de glicógeno [20 mg/ml] + 500 μL de etanol al 100% y se incubó durante 30 minutos a -20 °C. Al tiempo transcurrido, se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadieron 700 μL de etanol al 70%; se centrifugó durante 15 minutos a 14 000 rpm y se retiró el sobrenadante. Para retirar por completo los solventes empleados, los tubos eppendorf que contienen la ligación, se secaron durante 10 minutos en Savant y, al finalizar, se resuspendió la pastilla en 10 μL de agua mQ.

Con 5 μL de la reacción de ligación, se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH10β. Las células se recuperaron en medio SOC (2 g de bacto triptona, 0.5 g de extracto de levadura, 0.2 ml de NaCl 5 M, 0.25 ml de KCl 1 M, 1 ml de MgCl 1M, 1 ml MgSO<sub>4</sub> 1M y 0.36 g de glucosa en 100 ml de agua) durante 2 horas a 37° C. Posteriormente se cultivaron en agar LB con ampicilina 100 μg/ml para seleccionar aquéllas células que hubieran adquirido el plásmido. Finalmente se seleccionaron diez colonias para llevar a cabo la extracción de plásmido por Miniprep.

Con la finalidad de evaluar que el plásmido pKK232-8 haya adquirido el inserto de interés, las muestras de extracción de plásmido por Miniprep, anteriores, se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa, contra el vector pKK232-8, sin inserto. Se seleccionaron 2-4 muestras positivas del ensayo anterior y se emplearon como molde para llevar a cabo PCR con los oligos que amplifican la región reguladora de *lon*, *clpX* y *clpXP*, respectivamente y se evaluó el producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.

Una vez analizada la evidencia anterior, se eligieron dos muestras positivas para secuenciar la región insertada, con la intención de verificar que ésta no hubiera sufrido mutaciones. La secuenciación se llevó a cabo por la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

#### **4. Construcción de la fusión transcripcional *rpoHΔCpxR-BS·cat***

Para la construcción de la fusión transcripcional *rpoHΔCpxR-BS·cat* se siguió el protocolo mencionado anteriormente, empleando los oligonucleótidos *rpoH-Hind* y *rpoH-Bam*, listados en la Tabla 5, utilizando como molde para el PCR, DNA genómico de la cepa *S. Typhimurium rpoHΔCpxR-BS::*. Se verificó la veracidad de esta construcción mediante secuenciación, llevada a cabo por la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

## 5. Construcción del plásmido pK3-CpxR

El gen *cpxR* se amplificó mediante PCR, empleando los oligos cpxR Rv 1 y cpxR Fw 1, listados en la Tabla 5, utilizando como molde DNA genómico de la cepa *S. Typhimurium* 14028.

Condiciones de PCR:

Temperatura (° C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
94	5	1 ciclo
94	1	30 ciclos
55	1	
70	1	
70	3	1 ciclo

Una vez obtenido el producto de PCR, se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa; se verificó, mediante el peso molecular, que la banda correspondiera con el producto deseado y se encontrara libre de contaminación. Posteriormente se purificó del gel la banda deseada, empleando el estuche comercial “AxyPrep DNA Gel Extraction Kit” (DNA Gel Extraction Spin Protocol) de Axygen.

Se digirió el producto de PCR con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, respectivamente, cuyos sitios de corte están contenidos dentro de los oligonucleótidos con los que se realizó la PCR.

Se llevó a cabo la purificación del vector de expresión pMPM-K3 (Tabla 4), empleando el estuche comercial “AxyPrep Plasmid Miniprep Kit” (AxyPrep Plasmid Miniprep Spin Protocol) de Axygen y fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, respectivamente.

La digestión, tanto del producto de PCR, como del plásmido, se llevó a cabo de la manera siguiente:

<b>Mezcla de reacción</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>μL</b>
Amortiguador de enzima	10
Enzima	2
DNA	*
H2O	cbp
Volumen final	100

\* El volumen de DNA a añadir, tanto de inserto como de vector, se determina a partir de electroforesis en gel de agarosa, depende de la intensidad y tamaño de la banda obtenida.

La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas a 37°C, posteriormente el DNA se limpió de los componentes de la reacción con el estuche comercial “AxyPrep PCR Cleanup Kit” (PCR clean-up spin protocol) de Axygen. Se verificó la digestión del vector mediante electroforesis en gel de agarosa y se procedió a la digestión con la segunda enzima, incubándose durante 2 horas a 37 °C.

Se limpió el DNA de cada digestión con el estuche comercial “AxyPrep PCR Cleanup Kit” (PCR clean-up spin protocol) y se evaluó la integridad de los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa.

A partir del proceso de ligación, referirse al protocolo descrito para las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*.

## 6. Construcción de la cepa *S. Typhimurium rpoHΔCpxR-BS*

La mutagénesis se llevó a cabo de acuerdo a la técnica descrita por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000), la cual se basa en reemplazar el gen o secuencia de interés, en este caso el sitio de reconocimiento del regulador CpxR (predicho por análisis de bioinformática) en la región reguladora del gen *rpoH* de *S. Typhimurium* 14028, con un gen seleccionable de resistencia a kanamicina. Para esto se obtuvo mediante PCR el casete de recombinación, utilizando los oligonucleótidos  $\Delta$ CpxR-BS (H1P1) y  $\Delta$ CpxR-BS (H2P2) (Tabla 5) y como molde el plásmido pKD4 (Tabla 4), el cual contiene el gen de resistencia a kanamicina, flanqueado por sitios de reconocimiento de la recombinasa (FTRs). El extremo 5' de los oligos antes mencionados, consta de 42 nucleótidos homólogos a la región que flanquea a la secuencia que se desea remover y el extremo 3' consta de 21 nucleótidos homólogos a la secuencia que flanquea el casete de Km en el plásmido pKD4 (Tabla 4). En este procedimiento, la recombinación requiere la recombinasa del fago  $\lambda$  Rojo, la cual es sintetizada bajo el control de un promotor inducible por L-+-arabinosa, contenida en el plásmido termosensible y de bajo número de copia, pKD46.

Condiciones de PCR:

Temperatura (° C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
94	5	1 ciclo
94	1	} 30 ciclos
58	1	
70	1min 50 seg	
70	5	1 ciclo

A diez reacciones de la PCR anterior se añaden 100  $\mu$ l de acetato de amonio pH 7.8, 300  $\mu$ l de fenol y 300  $\mu$ l de una mezcla cloroformo-alcohol isoamílico. La mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 14 000 rpm. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos, se añadieron 500  $\mu$ l de cloroformo alcohol isoamílico, se centrifugó durante 5 minutos a 14 000 rpm, y se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos. Finalmente, para precipitar el producto de PCR, a cada tubo se añadió 1 ml de alcohol al 100%, se agitaron y dejaron reposar toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido el tiempo anterior, los tubos se centrifugaron durante 30 minutos a 14 000 rpm, se desechó el etanol, se añadió 1 ml de etanol al 70% a cada tubo y se centrifugaron durante 10 minutos a 14 000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el contenido de los tubos se secó durante 15 minutos a calor medio en Savant. Finalmente, la pastilla obtenida se resuspende en 16  $\mu$ l de agua mQ. Mediante electroforesis en gel de agarosa se verificó que el proceso de precipitación y concentración de la PCR haya sido exitoso.

5  $\mu$ l del producto de PCR concentrado se electroporaron en células electrocompetentes de la cepa *S. Typhimurium* 14028, las cuales se obtuvieron mediante un pre-inóculo de la cepa mencionada, en cajas de Petri conteniendo LB adicionado con ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , incubado a  $30^{\circ}\text{C}$ . Aproximadamente 40 colonias de este pre-inóculo se inocularon en 25 ml de medio de cultivo SOB (20 g de Bacto triptona, 5 g de extracto de levadura, 0.50 g de NaCl y 2.50 ml de stock 1M de KCl en 1 L de agua) + 25  $\mu$ l de ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  + 2.5 ml de L-+-arabinosa al 20%, el cual se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  en agitación hasta obtener una  $\text{DO}_{595}=0.6$ . Posteriormente el cultivo se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos a 8 000 rpm y se desechó el sobrenadante. La pastilla resultante se resuspendió en 1 ml de agua fría, se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos a 8 000 rpm, repitiendo este último procedimiento dos veces más. Finalmente la pastilla se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua fría.

Las células se recuperaron en medio SOC durante 3 horas a 30° C. Posteriormente se cultivaron en agar LB con kanamicina 25 µg/ml a 37°C. Las colonias obtenidas se sembraron por agotamiento en cajas de Petri conteniendo LB adicionado con kanamicina 25 µg/ml y se incubaron a 42°C. El procedimiento anterior se repitió dos veces. Finalmente, se seleccionaron 25 colonias y se inocularon en cajas de Petri sin antibiótico, con ampicilina 100 µg/ml y kanamicina 25 µg/ml, respectivamente. Se seleccionaron 3 muestras de aquellas colonias que crecieron en medio sin antibiótico y en medio adicionado con kanamicina, pero que no presentaron crecimiento en medio adicionado con ampicilina.

De las muestras anteriores se extrajo DNA genómico mediante el estuche comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit” de Promega. El DNA genómico obtenido se empleó como molde para verificar, mediante PCR, si el procedimiento de mutagénesis fue exitoso, empleando los oligos rpoH-Hind, rpoH-Bam, K1 y K2.

El casete de resistencia a kanamicina que se insertó en la cepa mutante, fue removido empleando el plásmido pCP20 (Ap<sup>R</sup>, con replicación sensible a temperatura, 30°C, e inducción térmica de la síntesis de la recombinasa FLP, 42°C, misma temperatura a la que se pierde también el plásmido), que expresa la recombinasa FLP, la cual reconoce secuencias directas repetidas FRT (FLP Recognition Targets), que flanquean el gen de resistencia insertado, con lo que al llevarse a cabo la recombinación entre estos sitios, se pierde el casete de resistencia (Datsenko y Wanner, 2000).

Células electrocompetentes de la cepa *S. Typhimurium rpoHΔCpxR-BS* se electroporaron con el plásmido pCP20, recuperando las células en medio SOC a 30°C durante 3 horas, permitiendo así que el plásmido se replique. Posteriormente se cultivaron en agar LB con ampicilina 100 µg/ml a 30°C. Las colonias obtenidas se sembraron por agotamiento en cajas de Petri conteniendo LB adicionado con ampicilina 100 µg/ml y se incubaron a 30°C. Se tomaron 5 colonias y se sembraron por agotamiento en cajas de Petri conteniendo LB sin antibiótico,

incubando a 42°C. El procedimiento anterior se repitió dos veces, con la finalidad de que se exprese la recombinasa, por lo tanto se pierda el casete de Km y, a su vez, el plásmido termosensible pCP20. Finalmente, se seleccionaron 25 colonias y se inocularon en cajas de Petri sin antibiótico, con ampicilina 100 µg/ml y kanamicina 25 µg/ml, respectivamente. Se seleccionaron 3 muestras de aquellas colonias que crecieron únicamente en medio sin antibiótico, las cuales son presuntas mutantes que han perdido el casete de resistencia a Km. La construcción de esta cepa se evaluó mediante PCR, empleando como molde DNA genómico extraído de las muestras anteriormente mencionadas y los oligonucleótidos rpoH-Hind/rpoH-Bam, K1 y K2.

## 7. Construcción de la cepa *S. Typhimurium lon* · FLAG

El gen cromosomal *lon* fue etiquetado con el epítotope FLAG en la cepa *S. Typhimurium* 14028, empleando una modificación del sistema del fago λ Rojo para la mutagénesis, descrito previamente (Datsenko y Wanner, 2000), la cual consiste en la adición en fase del epítotope FLAG al final del gen cromosomal que se quiere etiquetar, sustituyendo el codón de término (Uzzau *et al.*, 2001).

Para lograr lo anterior, se amplificó mediante PCR el epítotope FLAG y el gen de resistencia a kanamicina, contenidos en el plásmido pSUB11 (Tabla 4), utilizando los oligonucleótidos lonFLAG-F/lonFLAG-R (Tabla 5). El extremo 5' de estos oligos consta de 40 nucleótidos homólogos a la región que flanquea al codón de paro del gen *lon*, y el extremo 3' consta de 21 nucleótidos homólogos a la secuencia que flanquea el epítotope FLAG en el plásmido pSUB11 (Tabla 4). En este procedimiento, al igual que para la mutagénesis, la recombinación requiere la recombinasa del fago λ Rojo, la cual es sintetizada bajo el control de un promotor inducible por L-+-arabinosa, contenida en el plásmido termosensible y de bajo número de copia, pKD46.

Condiciones de PCR:

Temperatura (° C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
94	5	1 ciclo
94	1	} 30 ciclos
58	1	
70	1min 30 seg	
70	3	1 ciclo

A partir de la obtención del PCR anterior, se sigue el mismo procedimiento que para la generación de la mutante *S. Typhimurium rpoHΔCpxR-BS*. Finalmente se verifica la construcción de la cepa *S. Typhimurium lon-FLAG*, mediante PCR, empleando los oligos lonRv(Hind), lonFwd(Kpn), K1 y K2.

## 8. Monitoreo de la expresión génica mediante el gen reportero *cat*

La determinación de la actividad de las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* se realizó como se ha descrito anteriormente (Puente *et al.*, 1996). Las cepas transformadas con las fusiones transcripcionales se cultivaron en 5 ml de medio LB adicionado con los respectivos antibióticos durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, en un matraz con 50 ml de medio LB adicionado con ampicilina, se inocularon 0.5 ml del cultivo crecido durante toda la noche; se incubó en baño con agitación a 37 °C. Se tomó 1 ml de muestra a las 6 h de incubación y se transfirió a tubos eppendorf; se centrifugó durante 2 minutos a 12 000 rpm, se lavó la pastilla celular con 800 µL de TDTT (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, DTT 3 µL) y se resuspendió en 600 µL de TDTT. Para obtener los extractos crudos, las muestras se sonicaron durante 3 minutos a intervalos de pulsos de 9.9 segundos. Al finalizar, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 12 000 rpm y el sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf nuevos.

La concentración de proteínas se determinó con el estuche comercial BCA “Protein Assay Kit Reagent” (Pierce), método en el cual las proteínas de la muestra reducen el  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$ , el BCA reacciona con éste y da color detectable a 562 nm. Para cuantificar las proteínas totales, 10  $\mu\text{L}$  del extracto se colocaron por duplicado en una placa de 96 pozos (Costar). Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de una mezcla de reacción (25 ml de solución A y 0.5 ml de solución B) del estuche para cuantificación de proteínas BCA “Protein Assay Kit Reagent” (Pierce). Las placas se incubaron durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se determinó la concentración de proteínas mediante la lectura de absorbancia a 562 nm en un lector automatizado de barrido para microplacas tipo CERES 900-C (Bio-tek instruments Inc.) y el software KC3™. Las lecturas obtenidas se interpolaron en una curva estándar de concentración de proteínas en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , previamente leída y almacenada en el programa KC3.

La cuantificación de la actividad enzimática de CAT se determinó colocando por duplicado 5  $\mu\text{l}$  de cada extracto en una placa de 96 pozos. Se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de una solución que contiene Tris-HCl pH 7.8 0.1M, DTNB 1mM (ácido 5,5’ ditiobis (2-ácido nitrobenzónico) (Research Organics, Inc), cloranfenicol 0.1 mM (Sigma) y acetil Co-A 0.1 mM (Pharmacia Biotech). Posteriormente se determinó la cinética de expresión de CAT mediante la lectura de absorbancia a 410 nm en el mismo lector automatizado para microplacas, a intervalos de 5 segundos durante 5 minutos, posicionado en el modo de cinética. Se utilizó una curva estándar (0 a 2500 U/ml) de actividad de la enzima CAT previamente leída y almacenada en el programa KC3, para interpolar las actividades de cada muestra. La actividad específica de CAT ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) se obtuvo al dividir las unidades de CAT entre la concentración de proteínas totales para cada extracto.

## 9. Inmunodetección de Lon mediante Western Blot

De cultivos bacterianos crecidos en agitación a 37°C durante toda la noche en 5 ml de medio LB, adicionado con los antibióticos correspondientes, se tomaron 100  $\mu$ L para la inoculación de 5 ml de medio LB fresco y se incubaron bajo las condiciones mencionadas.

Muestras de 1 ml de los cultivos anteriores, tomadas a las 4 horas de crecimiento, se centrifugaron 3 minutos a 12000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla de bacterias se resuspendió en 500  $\mu$ L de amortiguador de carga SDS-PAGE 1X. Estas muestras se calentaron a 80 °C durante 5 minutos y se visualizó el extracto de proteínas totales en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%, usando como amortiguador de corrida Tris-Glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0.1%), mediante tinción con colorante azul de Coomassie G-250.

Otro gel de los mismos extractos de proteínas se utilizó para la transferencia de éstas a una membrana de nitrocelulosa de poros de 0.45  $\mu$ m (Millipore), en una cámara de transferencia semi-seca (Bio-Rad), usando amortiguador de transferencia (Tris 48 mM, Glicina 39 mM, metanol 20%, SDS 0.0375%) durante 1 hora a 15 V. Las membranas que contenían las proteínas transferidas fueron bloqueadas con leche desgrasada al 5% en PBST (PBS 1X, Tween 20 al 0.03%) durante toda la noche.

Posteriormente las membranas se incubaron en agitación durante 4 horas con los anticuerpos monoclonales anti-FLAG M2 (SIGMA) o anti-DNAK (StressGen), diluidos en PBST 1:1,000 y 1:20,000, respectivamente. Transcurrido este tiempo, las membranas se lavaron con tres recambios de PBST, en agitación a intervalos de 15, 5 y 5 minutos. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón (PIERCE), diluido en PBST 1:10,000, para detectar a los anticuerpos anti-DnaK y anti-FLAG. Las membranas se mantuvieron en agitación

durante 1 hora. Al término de este tiempo, las membranas se lavaron con tres recambios de PBST, en agitación a intervalos de 15, 5 y 5 minutos.

Posteriormente, se agregó una mezcla 1:1 de los reactivos para revelado “enhanced luminol reagent” y “oxidizing reagent” del estuche comercial para revelado “Western Lightning Chemiluminiscense Reagent Plus” (Perkin Elmer Life Sciences) y se mantuvieron en agitación durante 1 minuto. Finalmente las membranas se expusieron en películas radiográficas (KODAK-Omat-LS-film).

## **10. Perfil de secreción de proteínas de SPI-1**

De cultivos bacterianos crecidos en agitación a 37°C durante toda la noche en 5 ml de medio LB, adicionado con los antibióticos correspondientes, se tomaron 100 µL para la inoculación de 5 ml de medio LB fresco y se incubaron bajo las condiciones mencionadas.

Muestras, por triplicado, de 1.5 ml de los cultivos anteriores, tomadas a la 9 hora de crecimiento, se centrifugaron durante 5 minutos a 14 000 rpm y 1.2 ml del sobrenadante se transfirieron a tubos nuevos. Se añadieron 200 µL de ácido tricloro acético al 100% (Mallinckrodtar), almacenando las muestras en refrigeración (4 °C) toda la noche, con la finalidad de precipitar las proteínas presentes. Las proteínas así precipitadas se concentraron mediante centrifugación durante 30 minutos a 14 000 rpm. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se disolvió en 25 µL de amortiguador de carga SDS-PAGE 1X y 2µL de Tris-HCl pH 11. Las muestras se calentaron a 80°C durante 3-5 minutos y se visualizaron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. Los geles se tiñeron con colorante azul de Coomassie G-250.

## 11. Purificación de la proteína CpxR

La proteína CpxR-6XHis se purificó a partir de la cepa *E. coli* BL21 pCA-CpxR, que contiene el plásmido pCA·CpxR. Este plásmido expresa la proteína CpxR con una fusión de 6 histidinas en su extremo amino terminal. La cepa *E. coli* BL21 pCA·CpxR se inoculó en un tubo de ensaye con 5 ml de medio LB adicionado con ampicilina, se incubó en agitación durante 9 horas. 1 ml del cultivo anterior se inoculó en 100 ml de medio LB adicionado con ampicilina; se incubó a 37 °C en agitación, hasta una  $DO_{595} = 0.6$ , punto en el cual se indujo la expresión de pCA·CpxR adicionando 1 mM de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) e incubando durante 4 horas más. Después de este tiempo se empaquetaron las células de todo el cultivo centrifugando a 10 000 rpm durante 6 minutos a 4 °C. Se resuspendió la pastilla celular en 12 ml de amortiguador de lisis (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol); fracciones de 1 ml de esta solución se transfirieron a tubos eppendorf y las muestras se sonicaron durante 3 minutos a pulsos de 9.9 segundos. Al finalizar se centrifugaron los tubos a 14 000 rpm durante 5 minutos; el sobrenadante se colectó en un sólo tubo. La muestra se purificó bajo condiciones nativas, mediante cromatografía de afinidad empleando una columna de sefaroza-níquel, la cual previamente se equilibró con 3 volúmenes de 10 ml de amortiguador de lisis. Posteriormente, se pasó a través de la columna el extracto crudo y se lavó con 4 volúmenes de 10 ml del amortiguador de lavado (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 20 y 50 mM Imidazol). Las proteínas se eluyeron empleando amortiguador de elución (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol), colectando fracciones de 1 ml.

Se evaluó qué fracciones contenían a la proteína CpxR, mediante un gel de poliacrilamida-SDS al 12% y tinción con colorante azul de Coomassie G-250. Se colectaron las 4 fracciones que mostraron tener a la proteína más concentrada y se sometieron a diálisis, inyectándolas en un casete "Slide-A-Lyzer" de Thermo Scientific, el cual se sumergió en 1 L del amortiguador de diálisis (20 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 25% Glicerol), con agitación a 4 °C, finalizando

con un recambio de 500 ml del mismo amortiguador de diálisis, bajo las mismas condiciones. Una vez dializada la muestra, se cuantificó la proteína mediante el método de Bradford. La concentración de la proteína purificada fue de 28.6  $\mu\text{M}$ . La muestra se almacenó en alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

## 12. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

Para realizar ensayos de retardo de la movilidad electroforética, se amplificó la región reguladora de los genes *rpoH* y *csrA* mediante PCR. Los productos de PCR se purificaron y concentraron mediante el estuche comercial “AxyPrep PCR Cleanup Kit” (PCR clean-up spin protocol) de Axygen.

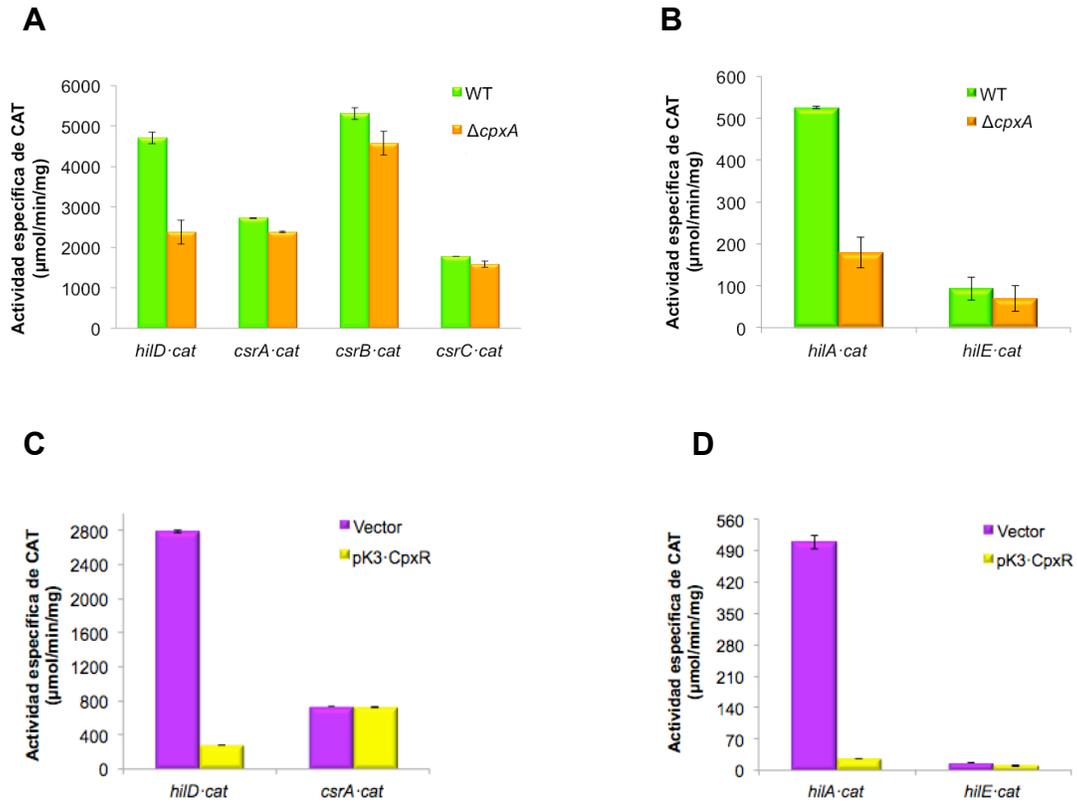
La proteína CpxR-6XHis purificada fue fosforilada mediante acetil-P, incubando 40  $\mu\text{L}$  de la proteína con 40  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosforilación (100 mM Tris- HCl pH 7.5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 125 mM KCl, 50 mM acetil-P), durante 1 hora. Posteriormente, la proteína fosforilada se incubó a concentraciones crecientes (0 a 1  $\mu\text{M}$ ), con los productos de PCR de las regiones reguladoras a analizar, durante 30 minutos a temperatura ambiente, en un amortiguador de unión (100 mM Tris- HCl pH 7.4, 100 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% Glicerol, 1.5 mM DTT, 1 mM EDTA). Las muestras se evaluaron en un gel de acrilamida no desnaturizante al 5%, con una corriente de 80 volts en regulador de corrida TBE 0.5X. Estos gels se tiñeron con bromuro de etidio para su visualización en el transiluminador.

## VII. RESULTADOS

### 1. CpxR-P reprime específicamente a los genes de SPI-1

Nuestros antecedentes indican que CpxR regula negativamente la expresión de los genes de SPI-1 (Figura 7) y sugieren que esto lo lleva a cabo al reprimir la expresión de *hilD* (Figura 8A), gen que codifica para el regulador HilD, que induce en cascada la expresión de los genes de SPI-1 (Figura 9). Con la finalidad de confirmar estos resultados y comenzar a definir si CpxR reprime directamente a *hilD* o lo hace indirectamente, regulando a alguno de los genes que controlan la expresión, concentración o actividad de HilD, analizamos el efecto de CpxR en la expresión de los genes *hilD* (SPI-1), *hilA* (SPI-1), *hilE*, *csrA*, *csrC* y *csrB*. Para esto, se determinó la expresión de fusiones transcripcionales de estos genes al gen reportero *cat*, contenidas en plásmidos, en la cepa *S. Typhimurium* WT y su derivada mutante  $\Delta cpxA$ . Nuestros antecedentes indican que en la mutante  $\Delta cpxA$  se acumula CpxR-P y que éste es quien reprime a los genes de SPI-1 (Figura 5). La expresión de las fusiones *hilD*·*cat* y *hilA*·*cat* se redujo en la mutante  $\Delta cpxA$ , con respecto a su expresión en la cepa WT; en contraste, la expresión de las fusiones de los genes localizados fuera de SPI-1, *csrA*·*cat*, *csrB*·*cat*, *csrC*·*cat* y *hilE*·*cat*, fue similar en la cepa WT y en la mutante  $\Delta cpxA$  (Figuras 10A y 10B).

Para confirmar estos resultados, se monitoreó la expresión de las fusiones *hilD*·*cat*, *hilA*·*cat*, *csrA*·*cat* y *hilE*·*cat* en la cepa *S. Typhimurium* WT que contiene el plásmido pK3·CpxR o el vector pMPM·K3. Para este análisis se construyó el plásmido pK3·CpxR, que expresa a CpxR bajo el promotor *lac*, el cual se expresa constitutivamente en *Salmonella*. Esto se hizo mediante la amplificación del gen cromosomal *cpxR*, por PCR, y su clonación en el vector pMPM·K3 (ver materiales y métodos). Consistente con los resultados obtenidos en la mutante  $\Delta cpxA$ , la expresión de las fusiones *hilD*·*cat* y *hilA*·*cat* disminuyó en presencia del plásmido pK3·CpxR, mientras que la expresión de las fusiones *csrA*·*cat* y *hilE*·*cat* no se afectó (Figuras 10C y 10D).



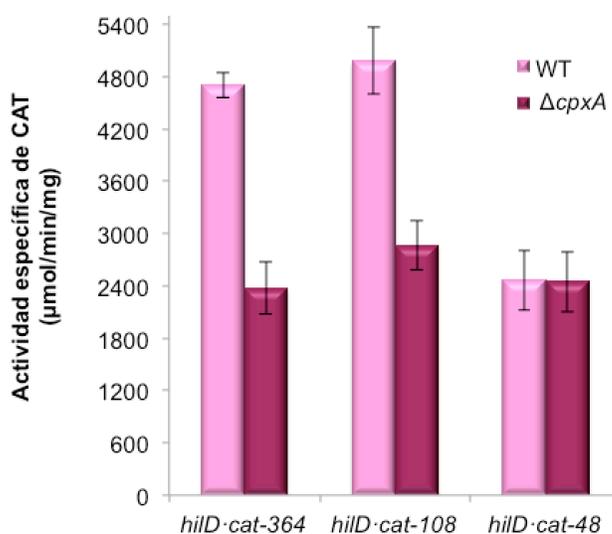
**Figura 10.** CpxR regula negativamente la expresión de *hilD* y *hilA*. La expresión de las fusiones *hilA-cat*, *hilD-cat*, *hilE-cat*, *csrA-cat*, *csrB-cat* y *csrC-cat*, contenidas en los plásmidos *philA-cat*, *philD-cat*, *philE-cat*, *pcsrA-cat*, *pcsrB-cat* y *pcsrC-cat*, respectivamente, se monitoreó en las cepas *S. Typhimurium* WT y en su derivada mutante  $\Delta cpxA$  (A y B); así mismo, la expresión de *hilD-cat*, *hilA-cat*, *csrA-cat* y *hilE-cat*, se monitoreó en la cepa silvestre que contiene el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-CpxR, que expresa constitutivamente a CpxR. La actividad específica de CAT se determinó de muestras de los cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas en medio LB, en agitación a 37 °C. Los datos que se muestran son el promedio de los resultados obtenidos en tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Cada dato se muestra con su desviación estándar respectiva.

En conjunto, estos resultados confirman que CpxR regula negativamente a los genes presentes en SPI-1, *hilD* y *hilA*, con lo cual se esperaría se afectara la expresión de todos los demás genes de la isla. Así mismo, estos resultados indican que CpxR no regula a los genes *hilE*, *csrA*, *csrB* y *csrC*, lo cual muestra que CpxR no regula a *hilD* a través de HilE, CsrA, CsrB o CsrC.

## 2. CpxR afecta la auto-regulación de *hilD*

Uno de los mecanismos que regulan positivamente la expresión de *hilD* es su auto-regulación, lo cual se requiere para la inducción de la expresión de los genes de SPI-1 (Olekhovich y Kadner, 2002; Ellermeier *et al.*, 2005). Sin embargo, *hilD* se puede expresar parcialmente en ausencia de su auto-regulación (Martínez *et al.*, 2011). En el laboratorio contamos con fusiones *hilD·cat* que contienen diferentes segmentos del extremo 5' de su región reguladora; las fusiones *hilD·cat-364* y *hilD·cat-108* contienen la secuencia necesaria para la autorregulación de *hilD* y la fusión *hilD·cat-48* carece de ésta. El número en cada una de estas fusiones indica la posición del extremo 5' de la región reguladora de *hilD* contenida en ellas. Nosotros planteamos la posibilidad de que si CpxR regulara negativamente la expresión de *hilD* actuando como un represor clásico, es decir uniéndose muy cerca o sobre el promotor, debería ser capaz de reprimir incluso la expresión de la fusión *hilD·cat-48*. Para investigar esto, determinamos la expresión de las fusiones *hilD·cat-364*, *hilD·cat-108* y *hilD·cat-48* en la cepa *S. Typhimurium* WT y su derivada mutante  $\Delta cpxA$ . Las fusiones *hilD·cat-364* y *hilD·cat-108* se expresaron a un nivel similar en la cepa WT y su expresión disminuyó, también de manera similar, en la mutante  $\Delta cpxA$  (Figura 11), indicando que CpxR no requiere de la región entre las posiciones -364 a -108 para reprimir la expresión de *hilD*. De acuerdo a lo esperado, la fusión *hilD·cat-48* presentó una expresión disminuida en la cepa WT, con respecto a la expresión de las *hilD·cat-364* y *hilD·cat-108* en esta misma cepa (Figura 11), lo cual se debe a que carece de la secuencia necesaria para la autorregulación positiva de *hilD*. Interesantemente, la fusión *hilD·cat-48*

mostró el mismo nivel de expresión en la cepa WT y en la mutante  $\Delta cpxA$ . Estos resultados indican que cuando *hilD* ya no se auto-regula, CpxR es ya incapaz de regular negativamente la expresión de este gen, sugiriendo esto que CpxR afecta la auto-regulación positiva de *hilD*.



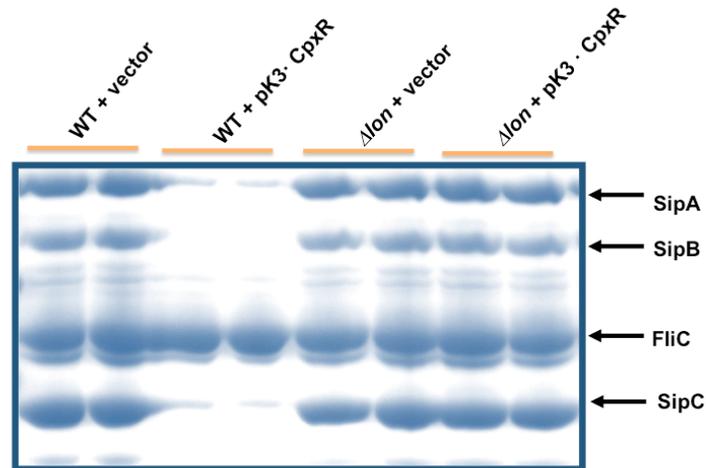
**Figura 11.** CpxR afecta la auto-regulación de *hilD*. La expresión de las fusiones *hilD-cat-364*, *hilD-cat-108* y *hilD-cat-48*, contenidas en los plásmidos *philD-cat*, *philD-cat-108* y *philD-cat-48*, respectivamente, que contienen distintos segmentos de la región reguladora de *hilD*, de la posición -364 a la +88, de la posición -108 a la +88 y de la posición -48 a la +88, respectivamente, se monitoreó en las cepa *S. Typhimurium* WT y en su derivada mutante  $\Delta cpxA$ . La actividad específica de CAT se determinó de muestras de los cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas en medio LB, en agitación a 37 °C. Los datos que se muestran son el promedio de los resultados obtenidos en tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Cada dato se muestra con su respectiva desviación estándar.

### 3. Es necesaria la presencia de Lon para que CpxR reprima la expresión de los genes de SPI-1

Uno de los mecanismos que controlan la concentración de HilD es su degradación mediada por la proteasa Lon (Boddicker y Jones, 2004; Takaya *et al.*, 2005). Así, una de las formas en que CpxR podría afectar la auto-regulación positiva de *hilD*, sería disminuyendo la concentración de la proteína HilD al incrementar la expresión de Lon. En apoyo a esto, resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que se requiere de Lon para que CpxR reprima la expresión de los genes de SPI-1.

Para definir si CpxR actúa a través de Lon para reprimir los genes de SPI-1, se analizó el efecto de la sobre-expresión de CpxR sobre el perfil de secreción de proteínas codificadas en SPI-1 (ver materiales y métodos), en la cepa *S. Typhimurium* WT y en su derivada mutante  $\Delta lon$ . Como se observa en la Figura 12, la sobre-expresión de CpxR reprimió la secreción de las proteínas codificadas en SPI-1 en la cepa *S. Typhimurium* WT (STM WT + pK3·CpxR), pero no en la mutante  $\Delta lon$  (STM  $\Delta lon$  + pK3·CpxR).

Estos resultados indican que se requiere de la presencia de Lon para que CpxR reprima la expresión de los genes de SPI-1. Así, CpxR podría regular positivamente, de manera directa o indirecta, la expresión de Lon, con lo cual se reduciría la concentración de HilD y, por lo tanto, la expresión de los genes de SPI-1.



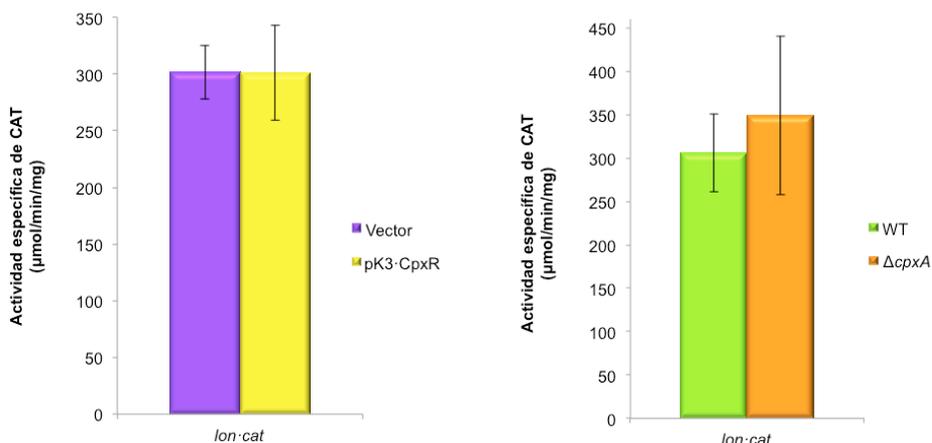
**Figura 12.** Es necesaria la presencia de Lon para que CpxR reprima la expresión de los genes de SPI-1. El perfil de secreción de las proteínas SipA, SipB y SipC, codificadas en SPI-1, se analizó en la cepa WT de *S. Typhimurium* y en su derivada mutante  $\Delta lon$ , transformadas con el vector pMPM-K3 o con el plásmido pK3-CpxR, el cual expresa a CpxR constitutivamente. Las muestras se obtuvieron del cultivo bacteriano respectivo crecido durante 9 horas en medio LB, en agitación a 37 °C. Los datos se muestran por duplicado, originados a partir de muestras independientes.

#### 4. Efecto de CpxR sobre la expresión de Lon

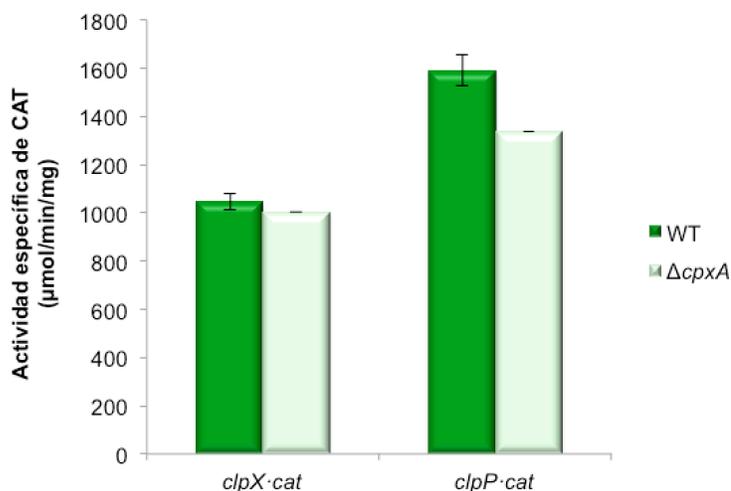
Para determinar si CpxR regula la expresión de Lon, se construyó una fusión transcripcional *lon-cat*, amplificando por PCR la región intergénica *clpX-lon* de 296 pb (Figura 13) y clonándola en el plásmido pKK232-8, corriente arriba del gen reportero *cat*, el cual carece de promotor (ver materiales y métodos). La expresión de esta fusión se determinó en los diferentes fondos genéticos donde se activa la regulación por CpxR. La expresión de la fusión *lon-cat* no se afectó en la mutante  $\Delta cpxA$  o con la sobre-expresión de CpxR (Figura 14).

Para *E. coli* se propone que *lon* puede transcribirse a partir del promotor localizado en la región intergénica de *clpX-lon*, pero también a partir de promotores localizados en las regiones intergénicas de *clpP-clpX* y *tig-clpP* (Figura 13). El contexto genético y la posible organización transcripcional del gen *lon* es similar en *S. Typhimurium* respecto a *E. coli* (Figura 13). Así, era posible que





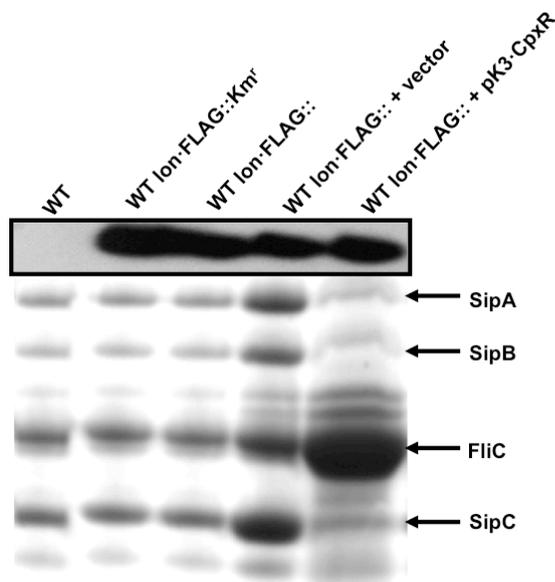
**Figura 14.** La expresión de la fusión *lon-cat* no se afecta en la mutante  $\Delta cpxA$  o con la sobre-expresión de CpxR. La expresión de la fusión transcripcional *lon-cat*, contenida en el plásmido *plon-cat*, se monitoreó en las cepas *S. Typhimurium* WT y su derivada mutante  $\Delta cpxA$ , así como en la cepa silvestre que contiene el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-CpxR, que expresa constitutivamente a CpxR. La actividad específica de CAT se determinó de muestras de los cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas en medio LB, en agitación a 37 °C. Los datos que se muestran son el promedio de los resultados obtenidos en tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Cada dato se muestra con su respectiva desviación estándar.



**Figura 15.** La expresión de las fusiones *clpX-cat* y *clpP-cat* no se afecta en la mutante  $\Delta cpxA$ . La expresión de las fusiones transcripcionales *clpX-cat* y *clpP-cat*, contenidas en los plásmido *pclpX-cat* y *pclpP-cat*, se monitoreó en las cepas *S. Typhimurium* WT y su derivada mutante  $\Delta cpxA$ . La actividad específica de CAT se determinó de muestras de los cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas en medio LB, en agitación a 37 °C. Los datos que se muestran son el promedio de los resultados obtenidos en tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Cada dato se muestra con su respectiva desviación estándar.

Debido a que con las fusiones transcripcionales arriba descritas, no se observó algún efecto de CpxR sobre la transcripción de *lon*, se determinó si CpxR afecta la concentración de la proteína Lon. Para esto se construyó una cepa de *S. Typhimurium* que expresa a la proteína Lon etiquetada con un epítipo 3xFLAG (Lon-FLAG) (ver materiales y métodos). Posteriormente, se analizó el efecto del plásmido pK3-CpxR sobre la concentración de Lon-FLAG mediante experimentos de Western Blot, utilizando anticuerpos anti-FLAG.

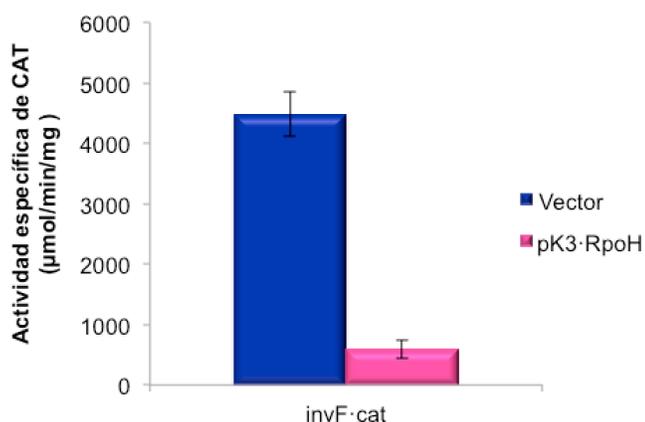
En apoyo a lo observado con las fusiones *lon-cat*, *clpX-cat* y *clpP-cat*, los niveles de Lon-FLAG no se afectaron por la sobre-expresión de CpxR (pK3-CpxR) (Figura 16). Estos resultados indican que CpxR no está afectando la expresión de Lon en las condiciones en las que reprime a los genes de SPI-1.



**Figura 16.** Inmunodetección de Lon-FLAG mediante Western Blot. La expresión de Lon-FLAG en la cepa silvestre que contiene el vector vacío pMPM-K3 o el plásmido pK3-CpxR, se analizó por ensayo de Western Blot mediante anticuerpos anti-FLAG. En la figura también se muestra la cepa de *S. Typhimurium* que expresa a la proteína Lon etiquetada con el epítipo 3xFLAG, conteniendo el casete de Kanamicina (WT lon-FLAG::Km<sup>r</sup>) y la cepa de *S. Typhimurium* que expresa a la proteína Lon etiquetada, a la que se le ha removido el casete de kanamicina (ver materiales y métodos). Las muestras se obtuvieron del cultivo bacteriano respectivo crecido durante 6 horas en medio LB, en agitación a 37 °C.

## 5. RpoH regula negativamente la expresión de los genes de SPI-1

En estudios previos se reportó que RpoH regula negativamente la expresión de los genes de SPI-1 (Matsui *et al.*, 2008) y que en *E. coli* CpxR regula positivamente la expresión de *rpoH* (Zahrl *et al.*, 2006). Con base en estos antecedentes, en nuestra hipótesis planteamos que CpxR podría actuar a través de *rpoH* para regular negativamente la expresión de los genes de SPI-1. Para corroborar el efecto de RpoH sobre los genes de SPI-1, se determinó la expresión de la fusión *invF-cat* en la cepa *S. Typhimurium* WT que contiene el vector vacío pMPM-K3 o el plásmido pK3-RpoH, que expresa constitutivamente a RpoH. La expresión de la fusión *invF-cat* disminuyó drásticamente ante la sobre-expresión de RpoH (Figura 17).

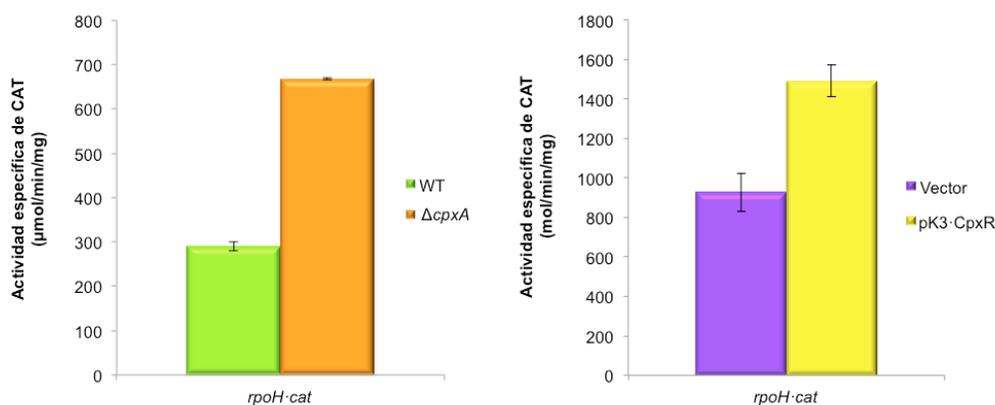


**Figura 17.** RpoH regula negativamente la expresión de *invF* (SPI-1). La expresión de la fusión transcripcional *invF-cat*, contenida en el plásmido *pinvF-cat*, se monitoreó en la cepa *S. Typhimurium* WT conteniendo el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-RpoH, que expresa constitutivamente a RpoH. La actividad específica de CAT se determinó de muestras de los cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas en medio LB, en agitación a 37 °C. Los datos que se muestran son el promedio de los resultados obtenidos en tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Cada dato se muestra con su respectiva desviación estándar.

Los resultados anteriores confirman que *rpoH* regula negativamente la expresión de los genes de SPI-1.

## 6. CpxR regula positivamente la expresión de *rpoH*

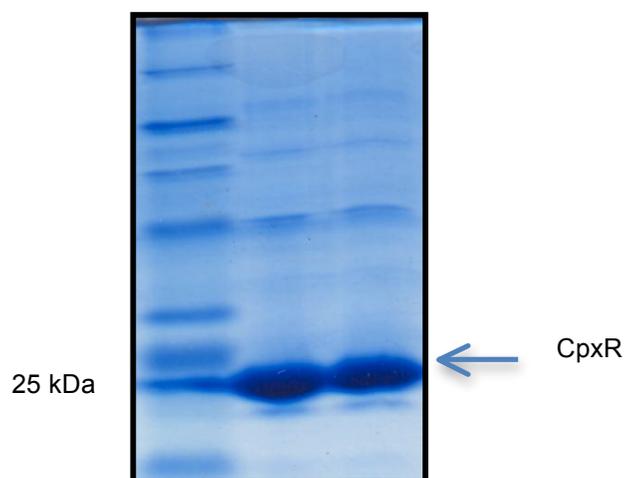
Para determinar si CpxR regula positivamente la expresión de *rpoH* en *Salmonella*, se monitoreó la expresión de una fusión transcripcional *rpoH-cat* en la cepa *S. Typhimurium* WT y su derivada mutante  $\Delta cpxA$ , así como en la cepa WT que contiene el vector vacío pMPM-K3 o el plásmido pK3-CpxR que expresa a CpxR. La expresión de esta fusión incrementó en la mutante  $\Delta cpxA$  (Figura 18A) y con la sobre-expresión de CpxR (Figura 18B).



**Figura 18.** CpxR regula positivamente la expresión de *rpoH*. La expresión de la fusión transcripcional *rpoH-cat* se monitoreó en las cepas *S. Typhimurium* WT y su derivada mutante  $\Delta cpxA$ , así como en la cepa silvestre que contiene el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-CpxR, que expresa constitutivamente a CpxR. La actividad específica de CAT se determinó de muestras de los cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas en medio LB, en agitación a 37 °C. Los datos que se muestran son el promedio de los resultados obtenidos en tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Cada dato se muestra con su respectiva desviación estándar.

Estos resultados muestran que CpxR regula positivamente la expresión de *rpoH*. Para determinar si esta regulación es directa, se quiso evaluar la posible interacción de CpxR con la región reguladora de *rpoH* mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).

Para llevar a cabo lo anterior, se purificó a la proteína CpxR-6XHis, de peso molecular de 25 KDa (Figura 19). Esta purificación se llevó a cabo bajo condiciones nativas, mediante cromatografía de afinidad con una resina de níquel, como se describe en materiales y métodos.



**Figura 19.** Proteína CpxR-6xHis purificada. Gel de poliacrilamida-SDS al 12% (teñido con colorante azul de Coomassie G-250) de dos fracciones eluidas de una columna de sefarosa-níquel, conteniendo a la proteína CpxR-6xHis (ver materiales y métodos).

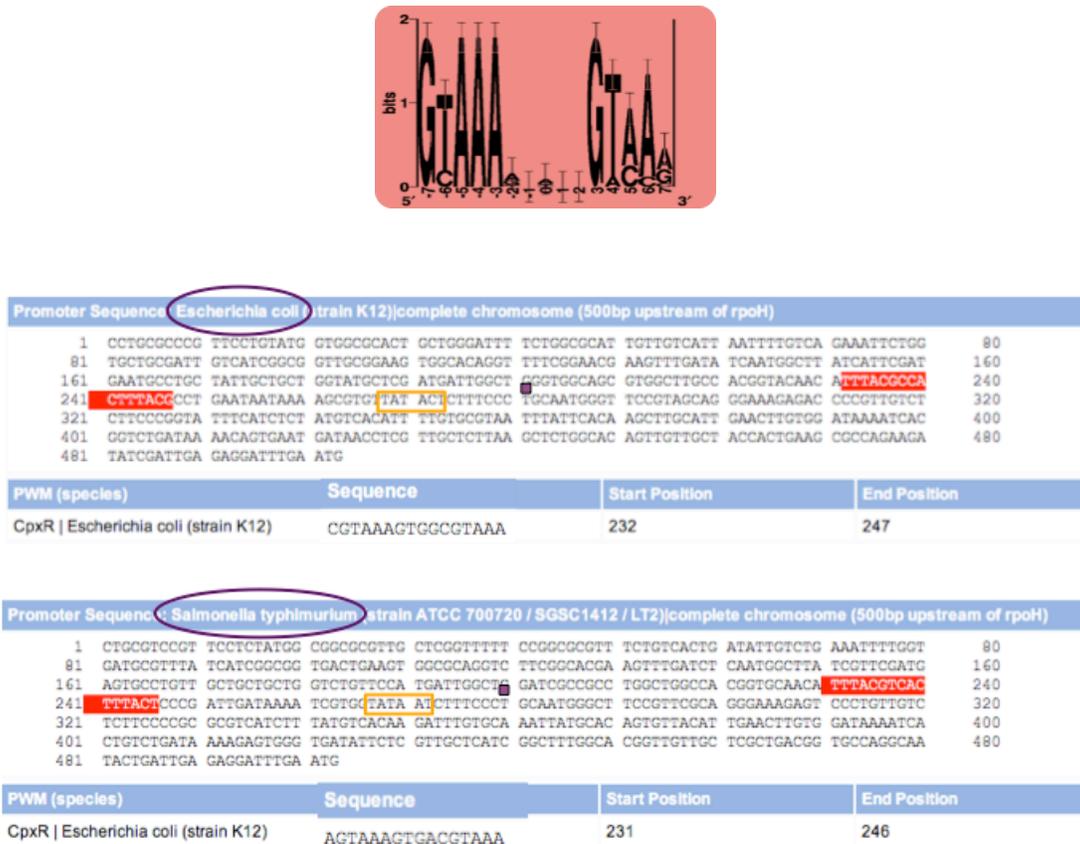
La proteína CpxR-6XHis purificada se fosforiló mediante Acetil-P, siguiendo el protocolo que se ha empleado en diferentes estudios para la fosforilación de esta proteína (Lynch y Lin *et al.*, 1996; Pogliano *et al.*, 1997 Nakayama y Watanabe, 1998; Carlsoon *et al.*, 2007) (ver materiales y métodos). Sin embargo, después de varios ensayos, con diferentes modificaciones, no se logró observar interacción de la proteína CpxR-6xHis fosforilada a la región reguladora de *rpoH*, ni a la de *csrA*, que usamos como control negativo, ya que CpxR no afecta la expresión de este último gen.

Como alternativa para definir si CpxR regula a *rpoH* directamente, se realizó un análisis bioinformático para predecir sitios de unión de CpxR en la región reguladora de *rpoH*, tanto de *S. Typhimurium* como de *E. coli*. Este análisis reveló la presencia de un posible sitio de unión de CpxR en *rpoH* de las dos bacterias, localizado a una distancia similar con respecto al codón de inicio (Figura 20). En *E. coli*, este sitio está localizado corriente arriba del promotor P<sub>1</sub> de *rpoH*, el cual se ha mostrado que se regula por CpxR (De Wulf *et al.*, 2002).

El probable sitio de unión de CpxR en *rpoH* se modificó en el cromosoma de *S. Typhimurium*, mediante la técnica de mutagénesis descrita por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000) (ver materiales y métodos), generándose en primera instancia la cepa que denominamos *S. Typhimurium rpoHΔCpxR-BS::Km<sup>R</sup>*. En esta cepa, la probable secuencia de unión de CpxR en la región reguladora de *rpoH* (5'-GTA AAG TGA CGT AAA-3') fue reemplazada por un casete de resistencia a kanamicina, a través de un evento de recombinación homóloga mediado por la recombinasa del fago λ Red. Posteriormente, a través de un segundo evento de recombinación, mediado por la recombinasa FLP, el casete de kanamicina se removió, dejando una secuencia corta conocida como "cicatriz" (5'-TGT AGG CTG GAG CTG CTT CGA AGT TCC TAT ACT TTC TAG AGA ATA GGA ACT TCG GAA TAG GAA CTA ACG AGG ATA TTC ATA TG-3'), originando así la cepa *S. Typhimurium rpoHΔCpxR-BS::* (Figura 21).

A partir de la cepa *S. Typhimurium rpoHΔCpxR-BS::* se construyó una fusión transcripcional de *rpoH* al gen reportero *cat* (*rpoHΔCpxR-BS·cat*), con los mismos oligos que se habían usado previamente para hacer la fusión *rpoH·cat* (WT), ver materiales y métodos. La fusión *rpoHΔCpxR-BS·cat* carece entonces del probable sitio de unión de CpxR que se identificó por el análisis de bioinformática. La expresión de la fusión *rpoHΔCpxR-BS·cat* se analizó en la cepa *S. Typhimurium* WT y su derivada mutante *ΔcpxA*. En contraste al incremento de la expresión que se observa para la fusión *rpoH·cat* WT en la cepa *ΔcpxA*, la expresión de la fusión

*rpoH*Δ*CpxR*-BS-*cat* no se afectó en esta cepa mutante con respecto a su expresión en la cepa WT (Figura 22).

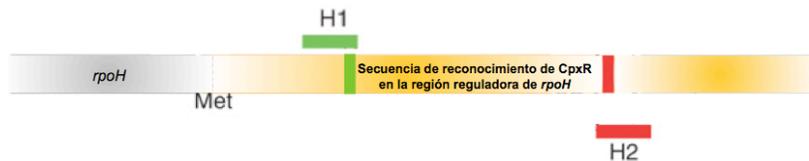


**Figura 20.** Predicción de un sitio de unión de CpxR en la región reguladora de *rpoH* de *E. coli* y *S. Typhimurium* mediante “Virtual Footprinting”. **A.** Logo de la secuencia de reconocimiento de CpxR en *E. coli*; la conservación de las bases se mide en bits y se muestra como la altura relativa de cada base. La conservación total de la secuencia es de  $13.9 \pm 0.7$  bits (De Wulf, *et al.*, 2002). **B.** En la figura están localizados el sitio de inicio de la transcripción (recuadro morado), la región -10 (enmarcada en naranja) y la secuencia que reconoce CpxR en la región reguladora de *rpoH* (resaltada en rojo), a aproximadamente 250 pb corriente arriba del codón de inicio de *rpoH*, tanto en *E. coli*, como en *S. Typhimurium*.

Amplificación del casete de resistencia a kanamicina flanqueado por FRTs.

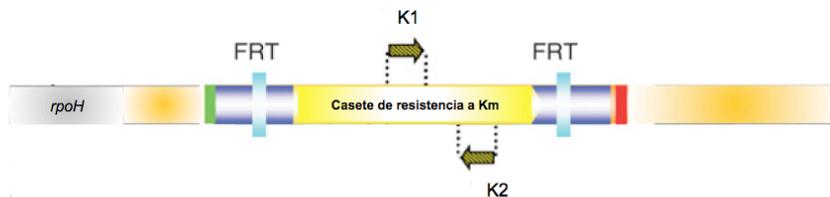


Transformación de la cepa *S. Typhimurium* expresando la recombinasa  $\lambda$  Rojo, con el producto de PCR anterior.



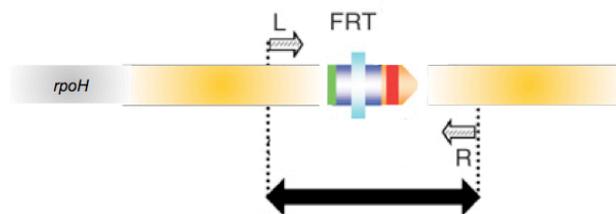
Selección de las transformantes resistentes a kanamicina.

Cepa *S. Typhimurium rpoH* $\Delta$ CpxR-BS::Km<sup>R</sup>

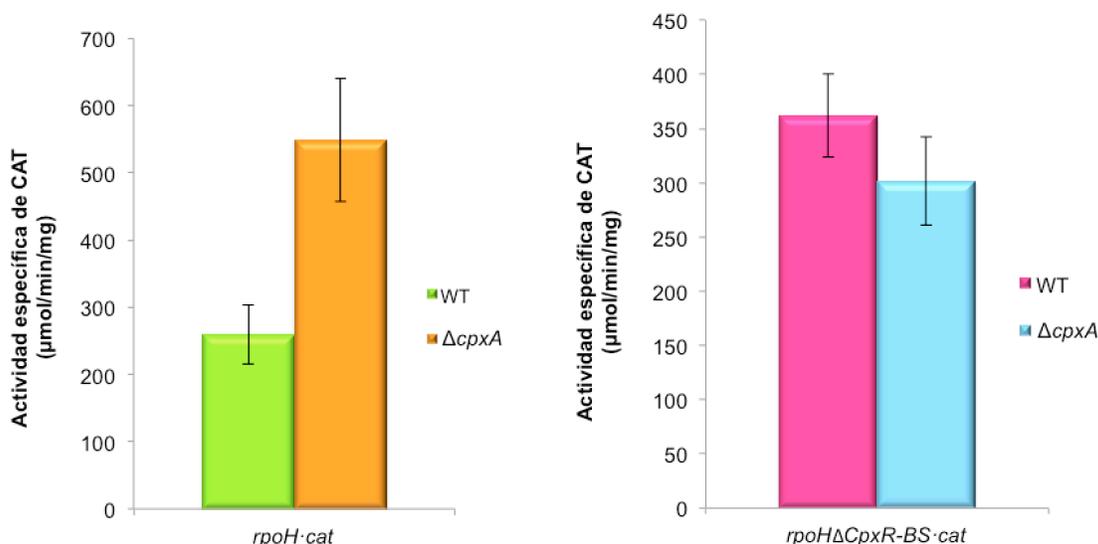


Remoción del casete de resistencia mediante la recombinasa FLP

Cepa *S. Typhimurium rpoH* $\Delta$ CpxR-BS::



**Figura 21.** Estrategia empleada para generar las cepas *S. Typhimurium rpoH* $\Delta$ CpxR-BS::Km<sup>R</sup> y *S. Typhimurium rpoH* $\Delta$ CpxR-BS:: (Datsenko y Wanner, 2000). La probable secuencia de unión de CpxR en la región reguladora de *rpoH* (5'-GTA AAG TGA CGT AAA-3'), en *S. Typhimurium*, fue reemplazada por un casete de resistencia a kanamicina, a través de un evento de recombinación homóloga mediado por la recombinasa del fago  $\lambda$  Rojo, originándose la cepa denominada *S. Typhimurium rpoH* $\Delta$ CpxR-BS::Km<sup>R</sup>. Posteriormente, a través de un segundo evento de recombinación, mediado por la recombinasa FLP, el casete de kanamicina se removió, dejando una secuencia corta conocida como "cicatriz" (5'-TGT AGG CTG GAG CTG CTT CGA AGT TCC TAT ACT TTC TAG AGA ATA GGA ACT TCG GAA TAG GAA CTA ACG AGG ATA TTC ATA TG-3'), originando así la cepa *S. Typhimurium rpoH* $\Delta$ CpxR-BS:: (ver materiales y métodos).

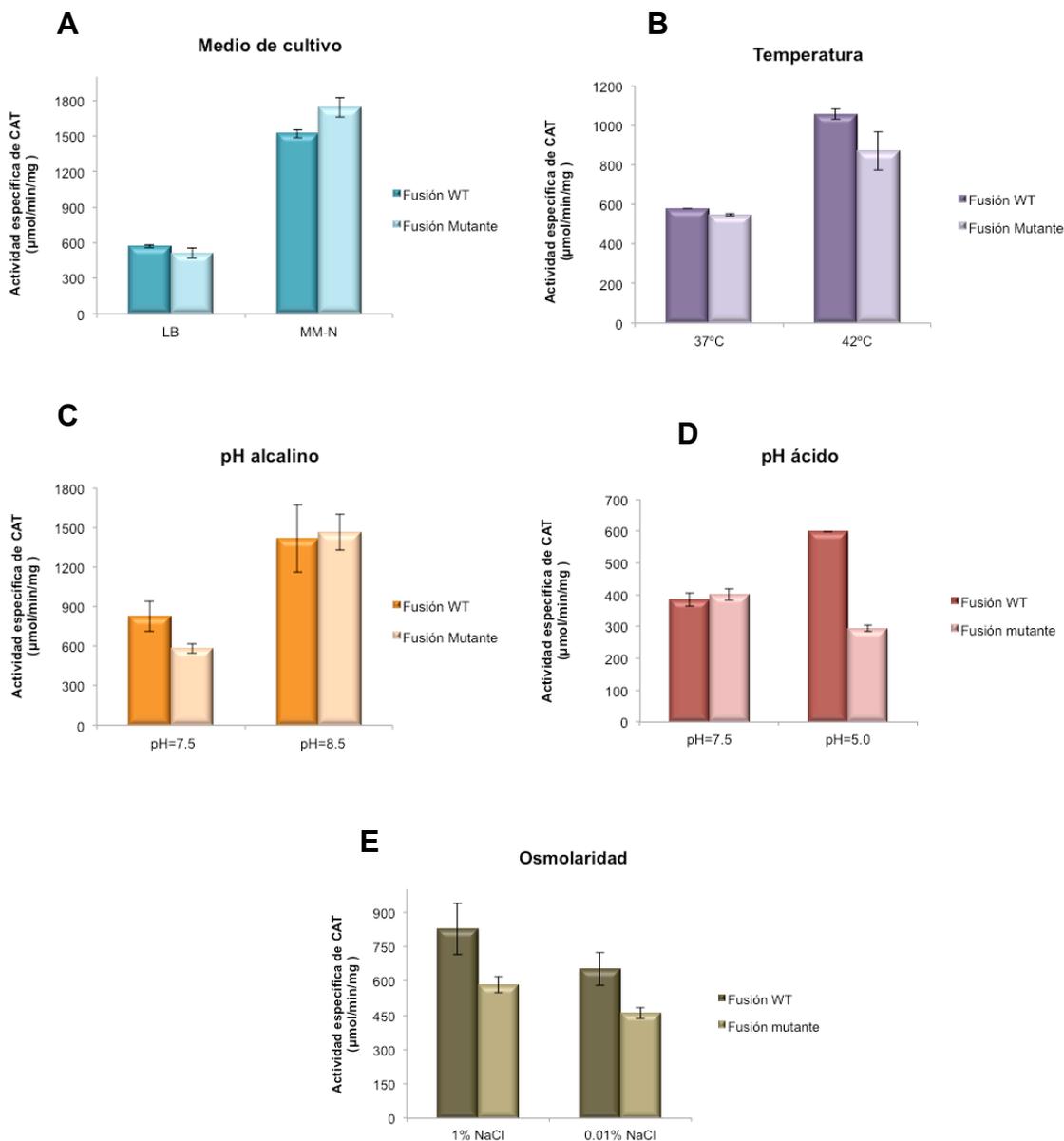


**Figura 22.** La secuencia predicha como sitio de unión de CpxR en *rpoH* es necesaria para la regulación positiva de *rpoH* mediada por este regulador. La expresión de las fusiones transcripcionales *rpoH-cat* y *rpoHΔCpxR-BS-cat*, contenidas en los plásmido *prpoH-cat* y *prpoHΔCpxR-BS-cat* respectivamente, se monitoreó en las cepas *S. Typhimurium* WT y su derivada mutante  $\Delta cpxA$ . La actividad específica de CAT se determinó de muestras de los cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas en medio LB, en agitación a 37 °C. Los datos que se muestran son el promedio de los resultados obtenidos en tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Cada dato se muestra con su respectiva desviación estándar.

Estos resultados indican que la secuencia predicha como sitio de unión de CpxR es necesaria para la regulación positiva de *rpoH* mediada por este regulador.

Los resultados mostrados anteriormente indican que CpxR regula la expresión de *rpoH* cuando el sistema CpxRA se enciende de manera artificial, ya sea en la mutante  $\Delta cpxA$ , en donde se acumula CpxR-P por acción de acetil-P, o mediante la sobre-expresión de CpxR. Se conoce que el sistema CpxRA se activa naturalmente en respuesta a diferentes tipos de estrés detectados en el periplasma, los cuales incluyen cambios en la osmolaridad, elevada temperatura, estrés oxidativo, contacto con pili,  $\text{Cu}^{2+}$ , cambios en el pH, superficies abióticas, EDTA, etanol y antibióticos (Jones *et al.*, 1997; Danese and Silhavy, 1998; Prigent *et al.*, 2001; Kershaw *et al.*, 2005; Zahrl *et al.*, 2006).

Para determinar si la activación natural del sistema CpxRA repercute en la expresión de *rpoH*, la expresión de la fusión WT *rpoH·cat* y su derivada fusión mutante *rpoH* $\Delta$ CpxR-BS·*cat* se analizó en la cepa *S. Typhimurium* WT crecida en diferentes condiciones: en los medios de cultivo LB y MM-N, en LB con pH 5.0 y 8.5, en LB con diferente osmolaridad (1% y 0.01% de NaCl) y en LB a diferente temperatura (37°C y 42°C). Como se muestra en la figura 23, la expresión de ambas fusiones incrementó de manera similar en el medio MM-N, en el medio LB a 42°C y en el medio LB con pH 8.5, con respecto a su expresión en el medio LB estándar, LB a 37°C y LB con pH 7.5, respectivamente; pero su expresión no se afectó por el cambio de osmolaridad. De modo interesante, en LB con pH ácido hubo un incremento de la expresión únicamente de la fusión WT, lo cual sugiere fuertemente que en esta condición de crecimiento CpxR induce de manera natural la expresión de *rpoH* (Figura 23D).



**Figura 23.** CpxR regula positivamente la expresión de *rpoH* al encender el sistema CpxRA de manera natural, para lo cual se requiere de la secuencia predicha como sitio de unión de CpxR localizada en la región reguladora de *rpoH*. La expresión de las fusiones transcripcionales *rpoH-cat* (fusión silvestre) y *rpoHΔCpxR-BS-cat* (fusión mutante), contenida en los plásmidos *prpoH-cat* y *prpoHΔCpxR-BS-cat*, respectivamente, se monitoreó en la cepa *S. Typhimurium* WT crecida en diferentes condiciones: en los medios de cultivo LB y MM-N, en LB con diferente pH (pH 5.0 y 8.5), en LB con diferente osmolaridad (1% y 0.01% de NaCl) y en LB a diferente temperatura (37°C y 42°C). La actividad específica de CAT se determinó de muestras de los cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas. Los datos que se muestran son el promedio de los resultados obtenidos en tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Cada dato se muestra con su respectiva desviación estándar.

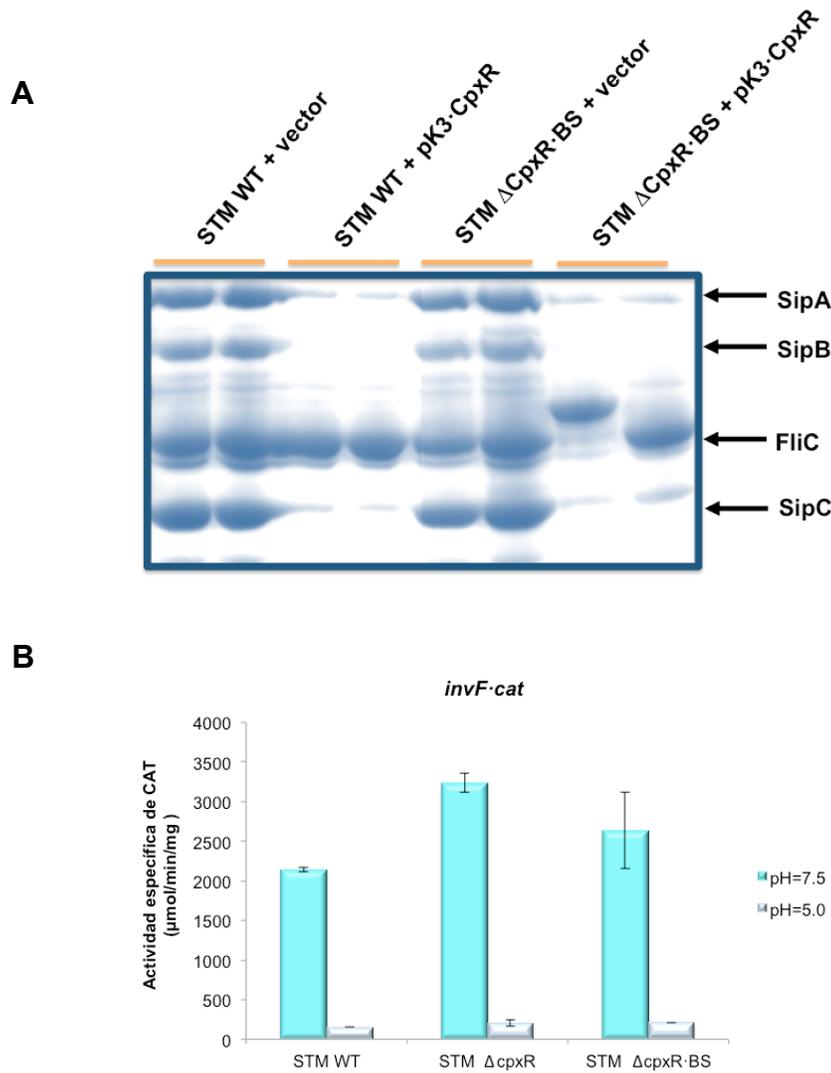
En conjunto, estos resultados muestran que CpxR regula positivamente la expresión de *rpoH*, para lo cual se requiere de la secuencia predicha como sitio de unión de CpxR localizada en la región reguladora de *rpoH*.

### **7. CpxR reprime la expresión de los genes de SPI-1 de manera independiente a la regulación que ejerce sobre *rpoH***

Los resultados descritos anteriormente muestran que la regulación positiva de *rpoH* mediada por CpxR, observada cuando se activa artificialmente a CpxR (en ausencia de CpxA o mediante su sobre-expresión), se pierde con la mutación de la secuencia consenso de unión de CpxR (Figura 22) localizada en la región reguladora de *rpoH* (Figura 20). Además, los resultados también indican que el crecimiento a pH 5 es una condición natural en la que CpxR incrementa la expresión de *rpoH* (Figura 23).

Para determinar si CpxR reprime la expresión de los genes de SPI-1 a través de RpoH, se evaluó el efecto de CpxR sobre los genes de SPI-1 en la cepa que tiene mutada la secuencia consenso de unión de CpxR en *rpoH* en el cromosoma (*S. Typhimurium rpoHΔCpxR-BS*). Por otro lado, se determinó si a pH 5 se reprime la expresión de los genes de SPI-1 y si, en su caso, dicha represión requiere de CpxR o de la regulación de *rpoH* mediada por CpxR.

Primero se analizó el efecto de la sobre-expresión de CpxR (a partir del plásmido pK3-CpxR) sobre el perfil de proteínas de SPI-1 secretadas al medio, en las cepas *S. Typhimurium* WT y su derivada mutante *rpoHΔCpxR-BS*. Como se observa en la Figura 24-A, la sobre-expresión de CpxR tuvo un efecto represor sobre la secreción de las proteínas de SPI-1, tanto en la cepa WT como en la mutante. Estos resultados sugieren que CpxR reprime a los genes de SPI-1 aún cuando ya no afecte la expresión de *rpoH*.



**Figura 24.** La represión de los genes de SPI-1, mediada por CpxR, es independiente de la regulación que ejerce CpxR sobre *rpoH*. **A.** La secreción de las proteínas SipA, SipB y SipC, codificadas en SPI-1, se analizó en la cepa *S. Typhimurium* WT (STM WT) y en su derivada mutante *rpoH* $\Delta$ CpxR·BS (STM  $\Delta$ CpxR·BS), transformadas con el vector pMPM-K3 (pK3) o con el plásmido pK3·CpxR que expresa a CpxR constitutivamente. Las muestras se obtuvieron del cultivo bacteriano respectivo crecido durante 9 horas en medio LB, en agitación a 37 °C. Los datos se muestran por duplicado, originados a partir de muestras independientes. **B.** La expresión de la fusión transcripcional *invF-cat* se monitoreó en las cepas *S. Typhimurium* WT (STM WT) y sus derivadas mutantes *S. Typhimurium*  $\Delta$ cpxR (STM  $\Delta$ cpxR) y *S. Typhimurium*  $\Delta$ cpxR·BS (STM  $\Delta$ CpxR·BS), crecidas en medio LB a pH 7.5 y 5.0, en agitación a 37°C. La actividad específica de CAT se determinó de muestras de los cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas. Los datos que se muestran son el promedio de los resultados obtenidos en tres diferentes experimentos realizados por duplicado. Cada dato se muestra con su respectiva desviación estándar.

Posteriormente se determinó la expresión de la fusión *invF-cat* (SPI-1) en la cepa *S. Typhimurium* WT y en sus derivadas mutantes  $\Delta cpxR$  y  $\Delta cpxR$ -BS (STM  $\Delta CpxR$ -BS) crecidas en LB a pH 7.5 y pH 5. La expresión de la fusión *invF-cat* disminuyó drásticamente cuando las bacterias se crecieron a pH 5, con respecto a su expresión a pH 7.5, presentando un patrón de expresión similar en la cepa WT y en las mutantes (Figura 24-B). Estos resultados muestran que el pH ácido reprime la expresión de los genes de SPI-1, pero por un mecanismo independiente de CpxR.

En conjunto, estos resultados indican que CpxR puede reprimir a los genes de SPI-1 en ausencia de la regulación de *rpoH* mediada por CpxR (Figura 24).

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El sistema de dos componentes CpxRA controla la respuesta de estrés extracitoplásmico que tiene lugar en el periplasma o envoltura celular de diversas bacterias (Dorel *et al.*, 2006; Duguay y Silhavy, 2004; Raivio, 2005; Rowley *et al.*, 2006). Entre los factores que se conocen activan este sistema de transducción de señales, se encuentra el ensamblaje de los pili y de sistemas de secreción (Jones *et al.*, 1997; Danese y Silhavy, 1998; Prigent *et al.*, 2001; Kershaw *et al.*, 2005; Zahrl *et al.*, 2006). Durante el ensamblaje de estos sistemas multiproteicos en el periplasma bacteriano, algunas subunidades escapan de la vía de ensamblaje o falla su interacción con chaperonas periplásmicas, como consecuencia, se forman agregados tóxicos de proteínas mal plegadas que se asocian con la membrana interna, generando así estrés en la envoltura celular (Hung, *et al.*, 1999; Jones, *et al.*, 1997). Esto induce la activación del sistema CpxRA, el cual induce la expresión de genes involucrados en el correcto ensamblaje de este tipo de estructuras bacterianas, así como también la expresión de genes involucrados en contener el estrés extracitoplásmico generado (Jones, *et al.*, 1997). En diferentes bacterias patógenas se ha demostrado que el sistema CpxRA está implicado en la expresión de determinantes de virulencia localizados en la envoltura celular. Entre estos se incluye el pili tipo IV de *Vibrio cholerae* (Peek y Taylor, 1992) y *Neisseria meningitidis* (Tinsley *et al.*, 2004), así como el sistema de secreción tipo III (SST-3) de *Shigella flexneri* (Watarai *et al.*, 1995; Yu, 1998; Yu *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2001), de *Yersinia pseudotuberculosis* (Liu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012 ) y *S. Typhimurium* (Ellermeier y Slauch, 2004; Miki *et al.*, 2004).

Los resultados de este proyecto, en conjunto con resultados generados previamente en nuestro laboratorio, muestran que CpxR en su forma fosforilada, reprime la expresión de los genes de SPI-1, incluyendo aquellos que codifican para el SST3. Nuestros resultados indican que CpxR reprime de manera específica la expresión de *hilD* y *hilA* (Figura 10), así como la secreción de las proteínas de SPI-1 (Figura 7). En *Salmonella*, HilD controla positivamente la

expresión de HilA y este a su vez a InvF; HilA e InvF regulan la expresión del resto de los genes de SPI-1 (Loströh *et al.*, 2000). Así, al reprimir a *hilD*, CpxR podría afectar la cascada de regulación de los genes de SPI-1; aunque no se puede descartar que CpxR afecte directamente a otros genes localizados en esta cascada de regulación corriente abajo de *hilD*.

Se sabe que la expresión de *hilD* se regula a diferentes niveles, hay auto-regulación positiva a nivel transcripcional, su traducción se regula negativamente por la proteína CsrA y a nivel pos-traducciona su actividad se regula negativamente por la interacción con la proteína HilE y su concentración se controla por la proteasa Lon (Figura 6) (Moest y Méresse, 2013; Fabrega y Vila, 2013).

Nuestros resultados muestran que CpxR es capaz de reprimir a *hilD* a nivel transcripcional (Figura 10A y Figura 10C); sin embargo, en ausencia de la secuencia de la región reguladora necesaria para la auto-regulación de *hilD*, lo cual genera una expresión basal de este gen, CpxR ya no presenta dicho efecto (Figura 11). Esto indica que CpxR podría disminuir la transcripción de *hilD* afectando su auto-regulación positiva y no actuando como un represor transcripcional clásico que reprime directamente al promotor. Así, CpxR podría afectar la concentración de la proteína HilD o evitar la unión de HilD a su propio gen.

Uno de los mecanismos por medio de los cuales se regula la concentración de HilD, es a través de la proteasa Lon. Nuestros resultados muestran que CpxR no reprime la expresión de los genes de SPI-1 en ausencia de Lon (Figura 12), lo cual podría sugerir que CpxR incrementa la expresión de Lon, de esta manera reduciría la concentración de HilD y como consecuencia se reprimiría la expresión de los genes de SPI-1. Sin embargo, CpxR no afectó a ninguno de los tres promotores que, se ha predicho, pueden transcribir a *lon* (Figura 14 y Figura 15), localizados corriente arriba de *lon*, *clpX* y *clpP* (Figura 13). Así mismo, al parecer

CpxR no afecta la concentración de Lon (Figura 16). Es posible entonces que CpxR induzca la expresión de algún factor que actúa junto con Lon para degradar a HilD. A la fecha no se conoce un factor en bacterias que afecte la actividad de Lon. Aunque se conoce que la proteína PinA del bacteriófago T4 interacciona reversiblemente con Lon e interfiere con su actividad ATPasa (Herman *et al.*, 1997; Hilliard *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 1983).

Es importante mencionar que nuestros resultados son consistentes también con una hipótesis alternativa, en donde en ausencia de Lon, la concentración de HilD incrementa de tal manera que la expresión de los genes de SPI-1 escapan de la regulación mediada por CpxR. En este sentido, nuestros análisis de bioinformática no revelaron algún probable sitio de unión de CpxR en la región reguladora de *hilD*, como sí lo hay en la de *rpoH*, como se describe más adelante. Así, cabe la posibilidad de que CpxR regule a *hilD* indirectamente e independiente de Lon, induciendo la expresión de algún factor que bloquee la auto-regulación de *hilD*.

En un estudio previo se mostró que la sobre-expresión de RpoH reprime la expresión de los genes de SPI-1, pero sólo en presencia de Lon (Matsui *et al.*, 2008). Nuestros resultados confirmaron este fenómeno (Figura 17). Aún queda por definir si RpoH reprime la expresión de los genes de SPI-1 incrementando la expresión de Lon. Sin embargo, en *E. coli* se ha reportado que RpoH regula la expresión de *lon* (Chin *et al.* 1988; Nonaka *et al.* 2006).

Se ha reportado que CpxR regula positivamente la expresión de *rpoH* en *E. coli*, probablemente actuando en un posible sitio de unión de CpxR localizado corriente arriba del promotor P<sub>1</sub> de *rpoH* (Zahrl *et al.*, 2006). Nuestros resultados muestran que CpxR regula también a *rpoH* en *S. Typhimurium* (Figura 18). Además, nuestros resultados indican que se requiere de la secuencia que se predice como un sitio de unión de CpxR, localizada en *rpoH* de *Salmonella*, en la misma posición que en *rpoH* de *E. coli*, para que CpxR reprima a *rpoH* (Figura 20),

lo cual sugiere fuertemente que dicha regulación es directa. Esto puede observarse tanto en las condiciones en las que se activa a CpxR de manera artificial, como en la mutante  $\Delta cpxA$  o con la sobre-expresión de CpxR (Figura 22), como cuando *Salmonella* crece en pH ácido (Figura 23).

Para confirmar que la regulación que ejerce CpxR sobre *rpoH* es de manera directa, se realizaron experimentos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA). Sin embargo, tras varios ensayos realizados, empleando tanto la proteína CpxR fosforilada, como no fosforilada, diferentes tiempos y condiciones de incubación para llevar a cabo la fosforilación y empleando diferentes amortiguadores de fosforilación y unión, no se logró visualizar la unión de CpxR con la región reguladora de *rpoH*. Aún cuando la proteína CpxR-6xHis es activa *in vivo*, ya que ésta reprime la expresión de los genes de SPI-1 (Figura 7), es posible que *in vitro* la proteína no se pliegue correctamente o que la fosforilación no se lleve a cabo con éxito debido a que la cola de histidinas en el extremo amino de esta proteína, interfiera de alguna manera con la fosforilación de la misma. La fosforilación de los reguladores de respuesta comúnmente induce los cambios estructurales necesarios para la formación de dímeros funcionales, un requisito para la eficiente unión al DNA objetivo (Liu *et al.*, 2011). En base a la homología con la familia de los reguladores de respuesta OmpR/PhoB, el aspartato conservado en la posición 51 (Asp<sub>51</sub>), es el sitio predicho de fosforilación de CpxR (Volz, 1993). La proteína que empleamos posee la cola de histidinas, necesaria para su purificación mediante cromatografía de afinidad, en el extremo amino, por lo que es probable que, *in vitro*, esta modificación interfiera en la correcta fosforilación de CpxR, ocasionando alteraciones en la unión a DNA. Se ha reportado la unión de CpxR-P a DNA blanco, cuando esta proteína contiene la cola de histidinas en el extremo carboxilo (Liu *et al.*, 2011).

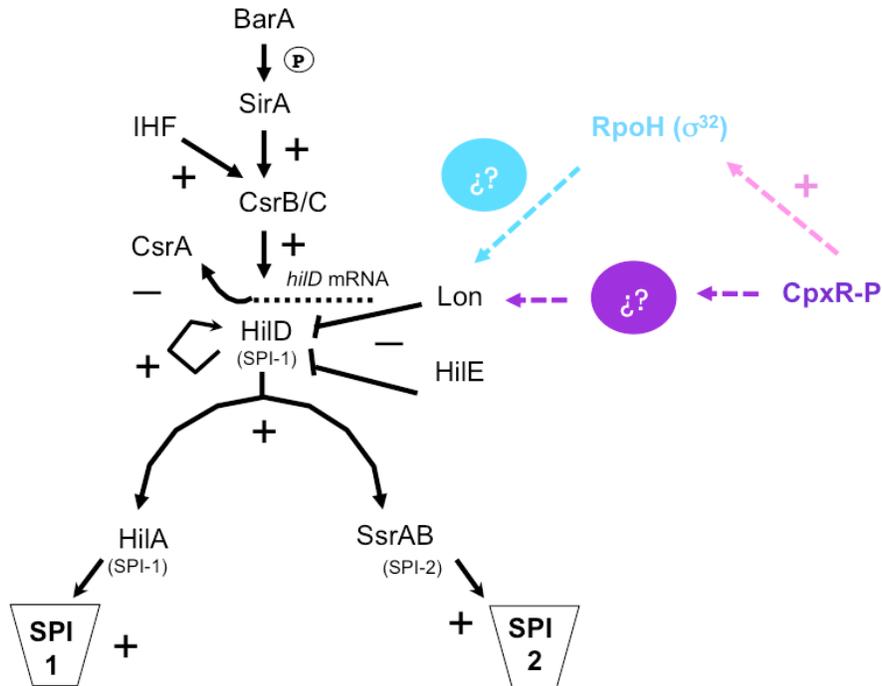
Para determinar si CpxR reprime la expresión de los genes de SPI-1 a través de RpoH, se quiso remover el gen *rpoH* del cromosoma de *S. Typhimurium*, pero a pesar de varios intentos esto no fue posible, lo que sugiere que la remoción de

*rpoH* podría ser letal para *Salmonella*. Sin embargo, CpxR reprimió la expresión de los genes de SPI-1 aún en la cepa de *S. Typhmuri* que carece en el cromosoma de la secuencia que se requiere para que CpxR regule a *rpoH*. Así, nuestros resultados indican que la regulación positiva de *rpoH*, mediada por CpxR, no es esencial para la represión de los genes de SPI-1 por CpxR. Es posible entonces que CpxR pueda reprimir la expresión de los genes de SPI-1 a través de RpoH y de otra vía independiente de RpoH.

Por otro lado, nuestros resultados mostraron que la expresión de los genes de SPI-1 se reprime cuando *Salmonella* crece en pH ácido, pero que aún cuando en esta condición CpxR induce la expresión de *rpoH*, no se requiere de la regulación de *rpoH* mediada por CpxR, ni de la presencia de CpxR, para este fenómeno. El pH ácido es una de las posibles señales que detecta *Salmonella* cuando se encuentra dentro de macrófagos, donde se ha visto que se reprime la expresión de los genes de SPI-1 y se induce la expresión de los genes de SPI-2 (Miller *et al.*, 1989; Garcia Vescovi *et al.*, 1996; Bijlsma y Groisman, 2005;). Así, *Salmonella* puede tener múltiples vías para reprimir la expresión de los genes de SPI-1, en respuesta a distintas condiciones de crecimiento, una de estas involucra a CpxR, como lo muestran nuestros resultados. A este respecto, resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio indican que los reguladores SsrB y SlyA, los cuales controlan positivamente la expresión de los genes de SPI-2, también reprimen de manera independiente a los genes de SPI-1.

En este trabajo, con base en resultados de estudios previos, se planteó la hipótesis de que CpxR reprime la expresión de los genes de SPI-1 al inducir la expresión de RpoH, que a su vez incrementaría la expresión de Lon, proteasa que degrada a HilD (Figura 9). Sin embargo, como se describe anteriormente, los resultados que se generaron en este estudio indican que CpxR reprime la expresión de los genes de SPI-1 por un mecanismo más complejo. CpxR regula positivamente a *rpoH*, pero esto no es esencial para la represión de los genes de SPI-1; CpxR requiere de la presencia de Lon para reprimir a los genes de SPI-1, pero parece no afectar la expresión de Lon. En conjunto, nuestros resultados

sugieren la existencia de vías múltiples por las cuales CpxR podría reprimir la expresión de los genes de SPI-1, alguna(s) de estas podría(n) involucrar a RpoH y a Lon, pero otra(s) también podría(n) actuar de manera independiente de RpoH e incluso de Lon (Figura 25).



**Figura 25.** Esquema que muestra la cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2. **En rosa:** CpxR regula, de manera positiva, la expresión del factor sigma alternativo RpoH, a partir de la secuencia consenso presente en el promotor p1 de *rpoH*, pero esta regulación no tiene impacto sobre la regulación que ejerce CpxR sobre los genes de SPI-1, en las condiciones de crecimiento evaluadas. **En morado:** CpxR regula negativamente la expresión de los genes de SPI-1 a través de la regulación negativa que ejerce sobre HilD; nuestros resultados indican que es necesaria la presencia de Lon para que CpxR lleve a cabo esta regulación. Es posible que CpxR induzca la expresión de algún factor que actúa junto con Lon para degradar a HilD. **En azul:** RpoH regula negativamente la expresión de los genes de SPI-1. Los antecedentes indican que es necesaria la presencia de Lon para que RpoH lleve a cabo esta regulación (Matsui *et al*, 2008), sin embargo, aún queda por definir si RpoH reprime la expresión de los genes de SPI-1 incrementando la expresión de Lon.

## IX. PERSPECTIVAS

- 1) Determinar el efecto de CpxR en la expresión de los genes de SPI-1 cuando se expresa a *HilD* bajo otro promotor. Con esto se podría confirmar si CpxR regula a *hilD* postranscripcionalmente, si afecta la concentración y estabilidad de *HilD* y si esto lo hace a través de la proteasa Lon.
- 2) Determinar con precisión si CpxR y RpoH afectan la expresión de Lon. Esto se podría hacer por experimentos de RT-PCR o de Western-blot (detectando a Lon-FLAG), usando diferentes concentraciones de RNA o proteínas totales de la cepa silvestre y sus derivadas mutantes que carecen de estos reguladores.
- 3) Definir si CpxR sólo actúa sobre *hilD* o si también afecta a la cascada de regulación de los genes de SPI1 a otro nivel, como podría ser actuado sobre *hilA*. Para esto se podría evaluar el efecto de CpxR sobre la expresión de *hilA* y otros genes de SPI-1, cuando la expresión de *hilA* es independiente de *HilD*, como en una mutante doble mutante que carezca de *HilD* y H-NS.
- 4) Identificar otros factores involucrados en la represión de los genes de SPI-1 mediada por CpxR. Esto se podría hacer mediante mutagénesis al azar por transposones de la cepa que carece de CpxA (CpxR reprime a los genes de SPI-1 en esta cepa), seleccionando mutantes que muestren des-represión de una fusión de un gen de SPI-1 al gen reportero *lacZ*.

## X. BIBLIOGRAFÍA

Akeda, Y. y Galan, J. E. (2005) Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**:911–915.

Altier, C. (2005) Genetic and Environmental Control of *Salmonella* Invasion. *J Microbiol* **43** (Spec No): 85-92.

Altier, C., Suyemoto, M., Ruiz, A.I., Burnham, K.D., y Maurer, R. (2000) Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Mol Microbiol* **35**:635–646.

Anjum, M.F., Marooney, C., Fookes, M., Baker, S., Dougan, G., Ivens, A. y Woodward, M.J. (2005) Identification of core and variable components of the *Salmonella enterica* subspecies I genome by microarray. *Infect Immun* **12**:7894-905

Baker, C.S., Morozov, I., Suzuki, K., Romeo, T. y Babitzke, P. (2002) CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**: 1599–1610.

Baxter, M.A., Fahlen, T.F., Wilson, R.L. y Jones, B.D. (2003) HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect Immun* **71**:1295–1305.

Bijlsma, J.J. y Groisman, E.A. (2005) The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **57**:85–96.

Boddicker, J.D. y Jones, B.D. (2004) Lon protease activity causes down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells. *Infect Immun* **72**:2002–2013.

Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R. y Swaminathan, B. (2000) *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol* **38**:2465–2467.

Brown, N.F., Vallance, B.A., Coombes, B.K., Valdez, Y., Coburn, B.A. y Finlay, B.B. (2005) *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS Pathog* **1**:16-32.

Bronstein, P.A., Miao, E.A. y Miller, S.I. (2000) InvB is a type III secretion chaperone specific for SspA. *J Bacteriol* **182**:6638–6644.

Brumell, J.H., Kujat-Choy, S., Brown, N.F., Vallance, B.A., Knodler, L.A. y Finlay, B.B. (2003) SopD2 is a novel type III secreted effector of *Salmonella typhimurium* that targets late endocytic compartments upon delivery into host cells. *Traffic* **4**:36–48

Bustamante, V.H., Martinez, L.C., Santana, F.J., Knodler, L.A., Steele-Mortimer, O. y Puente, J.L. (2008) HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:14591-14596.

Carlsson, K.E., Liu, J., Edqvist, P.J. y Francis M.S. (2007) Influence of the Cpx extracytoplasmic-stress-responsive pathway on *Yersinia sp.*-Eukaryotic cell contact. *Infect Immun* **75**:4386-4399.

Chavez, R.G., Alvarez, A.F., Romeo, T. y Georgellis, D. (2010) The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J Bacteriol* **192**:2009–2012.

Cherepanov, P.P. y Wackernagel, W. (1995) Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**(1): 9-14.

Chin, D.T., Goff, S.A., Webster, T., Smith, T. y Goldberg, A.L. (1988) Sequence of the lon gene in *Escherichia coli*. A heat-shock gene which encodes the ATP-dependent protease Lon. *J Biol Chem* **263**: 11718–11728.

Clements, M.O., Eriksson, S., Thompson, A., Lucchini, S., Hinton, J.C., Normark, S., Rhen, M. (2002) Polynucleotide phosphorylase is a global regulator of virulence and persistency in *Salmonella enterica*. *Proc Natl Acad Sci USA* **13**:8784:8789.

Coburn, B., Li, Y., Owen, D., Vallance, B.A. y Finlay, B.B. (2005) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* **73**:3219–3227.

Coombes, B.K., Brown, N.F., Valdez, Y., Brumell, J.H. y Finlay, B.B. (2004) Expression and secretion of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL. *J Biol Chem* **279**: 49804– 49815.

Danese, P.N., Silhavy, T.J. (1998) CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. *J Bacteriol* **180**: 831–839.

Darwin, K.H. y Miller, V.L. (1999) InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**: 4949–4954.

Datsenko, K.A. y Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS* **97**:6640-6645.

De Wulf, P., McGuire, A. M., Liu, X. y Lin, E.C.C. (2002) Genome-wide profiling of promoter recognition by the two component response regulator CpxR-P in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**:26652- 26661.

Dorel, C., Lejeune P. y Rodrigue A. (2006) The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? *Res Microbiol* **157**:306–314.

Duguay, A. R. y Silhavy T. J. (2004) Quality control in the bacterial periplasm. *Biochim Biophys Acta* **1694**:121–134.

Ehrbar, K., Friebel, A., Miller, S.I. y Hardt, W.D. (2003) Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) protein InvB in type III secretion of SopE and SopE2, two *Salmonella* effector proteins encoded outside of SPI-1. *J Bacteriol* **185**:6950–6967.

Eichelberg, K. y Galan, J.E. (1999) Differential regulation of *Salmonella typhimurium* type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-encoded transcriptional activators InvF and HilA. *Infect Immun* **67**: 4099–4105.

Ellermeier, C.D. y Slauch, J.M. (2004) RtsA coordinately regulates DsbA and the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *J Bacteriol* **186**:68–79.

Ellermeier, C.D., Ellermeier, J.R. y Slauch, J.M. (2005) HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **57**:691–705.

Ellermeier J.R. y Slouch J.A.M. (2007) Adaptation to the host environment: regulation of the SPI type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol* **10**:24-29.

Fabrega, A. y Vila. J. (2013). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Skills To Succeed in

the Host: Virulence and Regulation. *Clin Microbiol Rev* **26**(2):308-341.

Fahlen, T.F., Wilson R.W., Boddicker J.D. y Jones B.D. (2001). Hha is a negative modulator of *hilA* transcription, the *Salmonella typhimurium* invasion gene transcriptional activator. *J Bacteriol* **183**:6620-6629.

Fass, E. y Groisman E.A. (2009) Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol* **12**:199-204.

Foultier, B., Troisfontaines, P., Muller, S., Opperdoes, F.R. y Cornelis, G.R. (2002) Characterization of the *ysa* pathogenicity locus in the chromosome of *Yersinia enterocolitica* and phylogeny analysis of type III secretion systems. *J Mol Evol* **55**:37-51.

Fu, Y. y Galan, J.E. (1998) Identification of a specific chaperone for SptP, a substrate of the centisome 63 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **180**:3393–3399.

Galan, J.E. (2001) *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**:53-86.

Garcia Vescovi, E., Soncini, F.C. y Groisman E.A. (1996) Mg<sup>2+</sup> as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* **84**:165-174.

Ginocchio, C.C., Rahn, K., Clarke, R.C y Galan J.E. (1997) Naturally occurring deletions in the centisome 63 pathogenicity island of environmental isolates of *Salmonella* spp. *Infect Immun* **65**:1267-1272.

Grimont, P.A.D. y Weill, F.X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. In: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 9th Ed. Institut Pasteur, Paris, France.

Groisman, E.A. y Ochman, H. (1993) Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. *EMBO J* **12**:3229-3787.

Groisman, E.A. y Ochman, H. (1997). How *Salmonella* became pathogen. *Trends Microbiol* **5**:343–349.

Hansen-Wester, I. y Hensel, M. (2001) *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* **3**:549-559.

Hapfelmeier, S., Stecher, B., Barthel, M., Kremer, M., Muller, A.J. y Heikenwalder, M. (2005) The *Salmonella* pathogenicity island SPI-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar Typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* **174**:1675–1685.

Haraga, A., Ohlson, M.B. y Miller, S.I. (2008) *Salmonella* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* **6**:53-66.

Hensel, M., Shea, J.E., Bäumler, A.J., Gleeson, C., Blattner, F.R. y Holden, D.W. (1997a) Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* **179**:1105-1111.

Hensel, M., Shea, J.F., Raupach, B., Monack, D., Falkow, S., Gleeson, C. y Holden, D.W. (1997b) Functional analysis of *ssaJ* and the *ssaK/U* operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **24**:155-167.

Hensel, M., Hinsley, A.P., Nikolaus, T., Sawers, G. y Berks, B.C. (1999a) The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **32**:275-288.

Hensel, M., Nikolaus, T. y Egelseer, C. (1999b) Molecular and functional analysis indicates a mosaics structure of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Mol Microbiol* **31**:489-498.

Hensel, M. (2000) *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **36**:1015-1023.

Hensel M. (2004) Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* **294**:95-102.

Herman, C., Thevenet, D., D'Ari, R. y Boulloc, P. (1997) The HflB protease of *Escherichia coli* degrades its inhibitor lambda cIII, *J Bacteriol* **179**:358-363.

Higashide, W. y Zhou, D. (2006) The first 45 amino acids of SopA are necessary for InvB binding and SPI-1 secretion. *J Bacteriol* **188**:2411-2420.

Hilliard, J.J., Maurizi, M.R. y Simon L.D. (1998) Isolation and characterization of the phage T4 PinA protein, an inhibitor of the ATP-dependent Ion protease of *Escherichia coli*, *J Biol Chem* **273**:518-523.

Hong, K.H. y Miller, V.L. (1998) Identification of a novel *Salmonella* invasion locus homologous to *Shigella ipgDE*. *J Bacteriol* **180**:1793-1802.

Hung, D.L., Pinkner, J.S., Knight, S.D., y Hultgren, S.J. (1999) Structural basis of chaperone self-capping in P pilus biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:8178-8183.

Jones, C.H., Danese, P.N., Pinkner, J.S., Silhavy T.J. y Hultgren S.J. (1997) The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *EMBO J* **16**:6394-6406.

Jones, B.D. (2005) *Salmonella* Invasion Gene Regulation: A Story of Environmental Awareness. *J Microbiol* **43**:110-117.

Jones, M.A., Hulme, S.D., Barrow, P.A. y Wigley, P. (2007) The *Salmonella* pathogenicity island 1 and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken. *Avian Pathol* **36**:199- 203.

Karavolos, M.H., Roe A.J., Wilson M., Henderson J., Lee, J.J., Gally, D.L. y Khan C.M. (2005) Type III secretion of the *Salmonella* effector protein SopE is mediated via an N-terminal amino acid signal and not an mRNA sequence. *J Bacteriol* **187**: 1559-1567.

Kershaw, C.J., Brown, N.L., Constantinidou C., Patel M.D., Hobman J.L. (2005) The expression profile of *Escherichia coli* K-12 in response to minimal, optimal and excess copper concentrations. *Microbiology* **151**:1187-1198.

Kimbrough, T.G. y Miller, S.I. (2000) Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:11008-11013.

Kimbrough, T.G. y Miller, S.I. (2002) Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella* Typhimurium. *Microbes Infect* **4**:75-82.

Kubori, T. y Miller, S.I. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**:602-605.

Lawhon, S.D., Maurer, R., Suyemoto, M. y Altier, C. (2002) Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol* **46**:1451-1464.

Lee, S.H. y Galan, J.E. (2004) *Salmonella* type III secretion- associated chaperones confer

secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol* **51**:483–495.

Liu, J., Obi, I.R., Thanikkal, E.J., Kieselbach, T. y Francis, M.S. (2011) Phosphorylated CpxR Restricts Production of the RovA Global Regulator in *Yersinia pseudotuberculosis*. *PLoS ONE* **6**:e23314.

Liu, J., Thanikkal, E.J., Obi, I.R., Francis, M.S. (2012) Elevated CpxR-P levels repress the Ysc-Yop type II secretion system of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Res Microbiol* **163**:518-530.

Loströh, C.P. y Lee, C.A. (2001) The HilA box and sequences outside it determine the magnitude of HilA- dependent activation of *PprgH* from *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol* **183**: 4876–4885.

Loströh, C.P., Bajaj, V. y Lee, C.A. (2000) The *cis* requirements for transcriptional activation by HilA, a virulence determinant encoded on SPI-1. *Mol Microbiol* **37**: 300–315.

Lucchetti-Miganeh, C., Burrowes, E., Baysse, C. y Ermel, G. (2008) The post-transcriptional regulator CsrA plays a central role in the adaptation of bacterial pathogens to different stages of infection in animal hosts. *Microbiology* **154**:16–29.

Lucas, R.L., Loströh, C.P., DiRusso C.C., Spector M.P., Wanner B.L. y Lee C.A. (2000) Multiple Factors Independently Regulate *hilA* and Invasion Gene Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **182**: 1872-1882.

Lynch, A.S. y Lin E.C. (1996) Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *J Bacteriol* **178**: 6238-6249.

Marcus, S.L., Brumell, J.H., Pfeifer, C.G. y Finlay, B.B. (2000) *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* **2**: 145–156.

Martínez, L.C., Yakhin, H., Camacho, M., Georgellis, D., Babitzke, P., Puente, J.L. y Bustamante, V. (2011) Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Mol Microbiol* **80**(6):1637–1656.

Marlovits, T.C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D.R., Galán, J.E. y Unger, V.M. (2004) Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* **306**:1040–1042.

Matsui, M., Takaya, A. y Yamamoto, T. (2008)  $\sigma^{32}$ - mediated negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 expression. *J Bacteriol* **190**:6636-6645.

Mayer, M.P. (1995) A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**(1):41-46

McQuiston, J.R., Parrenas, R., Ortiz-Rivera, M., Gheesling, L., Brenner, F., Fields, P.I. (2004) Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fliB* y *fliA* from *Salmonella*. *J Clin Microbiol* **42**:1923–1932.

Miao, E. A. y Miller, S. I. (2000) A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:7539–7544.

Miki, T., N. Okada y H. Danbara. (2004) Two periplasmic disulfide oxidoreductases, DsbA and SrgA, target outer membrane protein SpiA, a component of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *J Biol Chem* **279**:34631–34642.

Miller, S.I., Kukral, A.M., Mekalanos, J.J. (1989) A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*. **86**:5054-5058.

Mills, D.M., Bajaj, V., Lee, C.A. (1995) A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol* **15**:749-759.

Moest, T.P. y Méresse, S. (2013) *Salmonella* T3SSs: successful mission of the secret(ion) agents. *Curr Opin Microbiol* **16**:38-44.

Nakayama, S.I. y Watanabe, H. (1998) Identification of *cpxR* as a positive regulator essential for expression of the *Shigella sonnei virF* gene. *J Bacteriol*. **180**:3522-3528.

Nakayama, S-I, Kushiro, A., Asahara, T., Tanaka, R-I, Hu, L., Kopecko D.J. y Watanabe, H. (2003) Activation of *hilA* expression at low pH requires the signal sensor CpxA, but not the cognate response regulator CpxR, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* **149**:2809–2817.

Nevesinjac, A.Z., Raivio, T.L. (2005) Envelope stress response affects expression of the type IV bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**:672-686.

Nonaka, G., Blankschien M., Herman C., Gross C.A., Rhodius V.A. (2006) Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor,  $\sigma_{32}$ , reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes Dev* **20**:1776-1789.

Olekhovich, I.N. y Kadner, R.J. (2002) DNA-binding activities of the HilC y HilD virulence regulatory proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**:4148–4160.

Olekhovich, I.N. y Kadner, R.J. (2006) Crucial roles of both flanking sequences in silencing of the *hilA* promoter in *Salmonella enterica*. *J Mol Biol* **357**:373–386.

Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T., Prentice, M.B., Sebahia, M., James, K.D., Churcher, C., Mungall, K.L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S.D., Brooks, K., Cerdeño-Tárraga, A.M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R.M., Davis, P., Dougan, G., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Leather, S., Moule, S., Oyston, P.C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S. y Barrell, B.G. (2001) Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**:523-527.

Pasavento C. y Hengee R. (2012) The global repressor FliZ antagonizes gene expression by  $\sigma$ S-containing RNA polymerase due to overlapping DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res* **40**:4783-4793.

Peek, J.A. y Taylor, R.K. (1992) Characterization of a periplasmicthiol: disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:6210–6214.

Pogliano, J., Lynch, S., Belin, D., Lin E.C.C. y Beckwith, J. (1997) Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes Dev* **11**:1169-1182.

Prigent-Combaret C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Lyini, P. y Dorel, C. (2001) Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene, *J Bacteriol* **183**:7213–7223.

Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W. y Schoolnik, G.K. (1996) The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* **20**:87-100.

Porwollik, S., Wong, R.M. y McClelly, M. (2002) Evolutionary genomics of *Salmonella*: gene acquisitions revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:8956–8961.

Raivio, T.L. (2005) Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol* **56**:1119–1128.

Rowley, G., Spector, M., Kormanec, J. y Roberts M. (2006) Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **4**:383–394.

Schechter, L.M., Damrauer, S.M. y Lee, C.A. (1999) Two AraC/XylS family members can independently counteract the effect of repressing sequences upstream of the *hilA* promoter. *Mol Microbiol* **32**:629–642.

Schechter, L.M. y Lee, C.A. (2001) AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella typhimurium hilA* promoter. *Mol Microbiol* **40**:1289–1299.

Schechter, L.M., Jain, S., Akbar, S. y Lee, C.A. (2003) The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU y Fis affect *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **71**:5432–5435.

Simon, L.D., Ryolph, B., Irwin, N. y Binkowski, G. (1983) Stabilization of proteins by a bacteriophage T4 gene cloned in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**:2059–2062.

Takaya, A., Kubota, Y., Isogai, E. y Yamamoto, T. (2005) Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads to downregulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Mol Microbiol* **55**:839–852.

Teplitski, M., Goodier, R.I. y Ahmer, B.M. (2006) Catabolite repression of the SirA regulatory cascade in *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* **296**:449–466.

Timmermans, J. y Van Melder, L. (2010) Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell Mol Life Sci* **67**:2897–2908.

Tinsley, C.R., Voulhoux, R., Beretti, J.L., Tommassen, J. y Nassif, X. (2004) Three homologues, including two membrane-bound proteins, of the disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*: effects on bacterial growth and biogenesis of functional type IV pili. *J Biol Chem* **279**:27078–27087.

Tucker, S.C. y Galan, J.E. (2000) Complex function for SicA, a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III secretion-associated chaperone. *J Bacteriol* **182**:2262–2268.

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

Voetsch, A.C., Van Gilder, T.J., Angulo, F.J., Farley, M.M., Shallow, S., Marcus, R., Cieslak, P.R., Deneen, V.C. y Tauxe, R.V. (2004) Food Net estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clin Infect Dis* **15**:S127–34.

Volz, K. (1993) Structural conservation in the CheY superfamily. *Biochemistry* **32**:11741–11753.

Wallis, T.S. y Galyov, E.E. (2000) Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol* **36**:997–1005.

Watarai, M., Tobe, T., Yoshikawa, M. y Sasakawa, C. (1995) Disulfide oxidoreductase activity of *Shigella flexneri* is required for release of Ipa proteins and invasion of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4927–4931.

Yu, J. (1998) Inactivation of DsbA, but not DsbC and DsbD, affects the intracellular survival and virulence of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **66**:3909–3917.

Yu, J., Edwards-Jones, B., Neyrolles, O., y Kroll, J.S. (2000) Key role for DsbA in cell-to-cell spread of *Shigella flexneri*, permitting secretion of Ipa proteins into interepithelial protrusions. *Infect Immun* **68**:6449–6456.

Yu, J., Oragui, E.E., Stephens, A., Kroll, J.S. y Venkatesan, M.M. (2001) Inactivation of DsbA alters the behaviour of *Shigella flexneri* towards murine and human-derived macrophage-like cells. *FEMS Microbiol Lett* **204**:81–88.

Zahrl, D., Wagner, M., Bischof, K. y Koraimann, G. (2006) Expression and assembly of a functional type IV secretion system elicit extracytoplasmic and cytoplasmic stress responses in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**:6611-6621.

Zhou D., Hardt, W.D. y Galan, J.E. (1999) *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect Immun* **67**:1974–1981.