



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Regulación negativa entre las dos principales islas de patogenicidad de *Salmonella enterica* mediada por el sistema de dos componentes Ssra/B

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARÍA MAGDALENA BANDA HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN
Instituto de Biotecnología, UNAM

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

Dra. ELDA GUADALUPE ESPIN OCAMPO
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. MARIO SOBERÓN CHÁVEZ
Instituto de Biotecnología, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente proyecto 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. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Dr. Mario Soberón Chávez

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Presidente Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Secretario Dra. Cinthia Ernestina Nuñez López

Vocal Dr. David Romero Camarena

Vocal Dr. Enrique Merino Pérez

Vocal Dra. Katy Juárez López

Durante el desarrollo de esta tesis recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 447726), así como apoyo de proyectos PAPIIT-UNAM (IN205512) y de CONACYT-CB (179071) para la realización de mi trabajo de investigación.

Con todo mi cariño y amor para las personas que me han apoyado toda la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, quienes han confiado en mí en todo momento, porque gracias a ustedes hoy puedo ver alcanzada esta meta. Por todo esto y más, esta tesis se las dedico a ustedes:

Mis padres, Irma y Magdaleno

Mis hermanos, Juan Carlos y David

AGRADECIMIENTOS

A mis cuñadas, Susana e Imelda, que me han brindado su amistad y me han apoyado en todo momento.

A mis sobrinos-hermanos, Juan Carlos e Iván, por el cariño incondicional que me han brindado y por todos esos momentos de felicidad que han compartido conmigo.

A mis amigas, Chelo, Erika, Gaby, Oly, Julia y América, que estuvieron apoyándome durante estos dos años. Gracias porque he podido contar con ustedes en todo momento.

Al Dr. Víctor Bustamante, por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección, por siempre estar al pendiente de mi trabajo y brindarme todas las herramientas necesarias para poder realizar este proyecto, mientras me transmitía su experiencia científica. Sin su apoyo y consejos este trabajo, y mi estancia en el laboratorio, no hubiera sido lo que fue. Gracias por su apoyo incondicional y su confianza en mí.

Al Dr. José Luis Puente, por darme la gran oportunidad de formar parte de su grupo y apoyarme durante estos dos años, por sus comentarios y críticas hacia mi trabajo, las cuales fueron fundamentales para la realización de este proyecto.

A todos mis compañeros de laboratorio, por hacer mi estancia agradable, apoyarme desde que llegué al laboratorio y sobre todo por brindarme su amistad.

A Pepe, la Sra. Rebeca y Xóchitl, por su gran labor en el laboratorio, su ayuda sin lugar a dudas fue esencial para poder realizar este trabajo.

A la Dra. Guadalupe Espín y al Dr. Mario Soberón, por formar parte de mi comité tutorial y brindarme consejos y críticas que enriquecieron mi trabajo.

A los miembros de mi jurado de tesis, la Dra. Cinthia Nuñez, la Dra. Katy Juárez, el Dr. Guillermo Gosset, el Dr. Enrique Merino y el Dr. David Romero, por sus comentarios y críticas hacia mi trabajo.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosín trifosfato
°C	Grados centígrados
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
Cl ⁻	Ión cloruro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EMSA	Ensayo de retardamiento en gel de la movilidad electroforética
h	Hora
Ig	Inmunoglobulina
kb	Kilobase
kV	Kilovoltios
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minuto
μl	Microlitro
ml	Mililitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
MM-N	Medio mínimo N
MQ	Milli-Q
ms	Milisegundo
nm	nanómetro
nM	Nanomolar
ORF	Marco de lectura abierta
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases

PBS	Amortiguador de fosfatos salinos
PBS-T	Amortiguador de fosfatos salinos con Tween
PCN	Fosfato-Carbono-Nitrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PAI	Isla de patogenicidad
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
RNA pol	RNA polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SCV	Vacuolas que contienen a <i>Salmonella</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
sRNA	RNA pequeño
SST3	Sistema de secreción tipo tres
TLRs	Receptores tipo Toll
UV	Ultravioleta
V	Voltios
WT	Cepa silvestre

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. El género <i>Salmonella</i> y su importancia	13
1.2. Factores de virulencia de <i>Salmonella</i>	15
1.2.1. Sistemas de secreción tipo III (SST3)	15
1.2.2. Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i> (SPIs)	17
1.2.2.1. SPI-1	19
1.2.2.2. SPI-2	20
1.2.3. Flagelo	21
1.3. Mecanismo de patogénesis	23
1.4. Regulación de la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2	27
1.4.1. Estímulos ambientales que inducen la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2	27
1.4.2. Reguladores positivos y negativos de SPI-1	28
1.4.3. Reguladores positivos y negativos de SPI-2	31
1.4.3.1. Sistema de dos componentes SsrA/B	32
1.5. Regulación de la expresión de los genes del flagelo	34
2. ANTECEDENTES	37
3. HIPÓTESIS	41
4. OBJETIVOS	41
4.1. Objetivo general	41
4.2. Objetivos particulares	41
5. MATERIALES Y MÉTODOS	42
5.1. Preparación de células electrocompetentes	48
5.2. Electroporación	48
5.3. Cultivos bacterianos para cuantificar la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2	49
5.4. Cuantificación de la actividad enzimática específica de CAT	

(Cloranfenicol Acetil Transferasa)	50
5.5. Construcción de los plásmidos que contienen las fusiones transcripcionales <i>flhD-cat</i> , <i>fliA-cat</i> , <i>hilDp-cat</i> , <i>hilDpMut-cat</i> y <i>hilDpMutG-cat</i>	52
5.6. Purificación de plásmidos	55
5.7. Perfil de proteínas secretadas	55
5.8. Ensayos de retardamiento en gel (EMSA, <u>E</u> lectrophoretic <u>M</u> obility <u>S</u> hift <u>A</u> ssays) con DNA	56
5.9. Inmunodetección de proteínas mediante “Western blot”	57
5.10. Construcción de la cepa mutante <i>flhDC::km</i>	58
5.11. Ensayo de movilidad en agar	59
6. RESULTADOS.....	60
6.1. SsrB controla negativamente la expresión de los genes de SPI-1	60
6.2. SsrB interactúa directamente con la región reguladora de <i>hilD</i> , <i>hilA</i> y <i>csrB</i>	62
6.3. SsrB reprime la expresión de los genes de SPI-1 en ausencia de <i>csrB</i>	64
6.4. SsrB reprime la expresión del promotor de <i>hilD</i>	67
6.5. SsrB regula negativamente a <i>hilA</i> en ausencia de <i>hilD</i> y <i>hns</i>	73
6.6. En ausencia de SsrB se obtiene únicamente una ligera des-represión de los genes de SPI-1	75
6.7. SsrB reprime a <i>fliC</i> a través de su interacción directa con la región reguladora de <i>flhD</i>	85
6.8. La represión de los genes flagelares mediada por SsrB no afecta la movilidad de <i>Salmonella</i>	88
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	92
8. PERSPECTIVAS	101
9. APÉNDICE.....	102
9.1. Medios de cultivo empleados	102
9.2. Reactivos utilizados para Western blot.....	104
10. REFERENCIAS	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del sistema de secreción tipo III de <i>Salmonella</i>	17
Figura 2. Organización genética de SPI-1	20
Figura 3. Organización genética de SPI-2.....	21
Figura 4. Estructura del flagelo bacteriano.	22
Figura 5. Modelo de patogénesis de <i>Salmonella enterica</i>	25
Figura 6. Regulación de la expresión génica de SPI-1.....	30
Figura 7. Regulación de la expresión génica de SPI-2.....	32
Figura 8. Secuencia consenso de unión reportada para SsrB.....	34
Figura 9. Regulación de la expresión de los genes del flagelo.....	36
Figura 10. Expresión de Hila y SsrB en diferentes fases del crecimiento de <i>S. Typhimurium</i> en el medio de cultivo LB.	38
Figura 11. Cascada de regulación de los genes de SPI-1 y SPI-2.....	38
Figura 12. La expresión constitutiva de SsrB reprime a los genes de SPI-1 y del flagelo	40
Figura 13. Esquema de la fusión transcripcional <i>flhD-cat</i>	54
Figura 14. Esquema de la fusión transcripcional <i>fliA-cat</i>	54
Figura 15. Esquema de la fusión transcripcional <i>hilDp-cat</i>	54
Figura 16. Esquema de la fusión transcripcional <i>hilDpMut-cat</i>	54
Figura 17. Esquema de la fusión transcripcional <i>hilDpMutG-cat</i>	54
Figura 18. La sobre-expresión de SsrB reprime la expresión de <i>hilA</i> , <i>hilD</i> , <i>invF</i> y <i>csrB</i>	61
Figura 19. SsrB interactúa directamente con las regiones reguladoras de <i>csrB</i> , <i>hilD</i> y <i>hilA</i> , pero no con las de <i>sirA</i> , <i>csrC</i> y <i>csrA</i>	63
Figura 20. SsrB no requiere de la presencia de CsrB para reprimir la secreción de proteínas codificadas en SPI-1 y la expresión de <i>hilD</i>	65
Figura 21. SsrB interactúa directamente con la región reguladora de <i>csrB</i> comprendida entre la posición -114 y -50 con respecto al inicio de la transcripción de este gen.....	66

Figura 22. SsrB no requiere de HilE y Lon para reprimir a <i>hilD</i>	68
Figura 23. SsrB requiere de la región entre las posiciones -48 y +88 para regular a <i>hilD</i>	69
Figura 24. SsrB reprime al promotor de <i>hilD</i> al interactuar directamente con la secuencia contenida entre las posiciones -37 a la +6 de la región reguladora de este gen.....	70
Figura 25. SsrB reprime en ausencia de <i>hilD</i> y <i>hns</i> la expresión de <i>hilA</i> , <i>hilD</i> y <i>csrB</i>	74
Figura 26. Los genes de SPI-1 no se des-reprimen en ausencia de SsrB en medio LB ni en MM-N.....	76
Figura 27. Los genes de SPI-1 no se des-reprimen en ausencia de SsrB en medio MM-N a pH ácido.....	77
Figura 28. En experimentos de RNA-seq se detecta la des-represión los genes de SPI-1 en ausencia de SsrB.....	78
Figura 29. Los genes de SPI-1 no se des-reprimen en ausencia de SsrB en medio PCN.....	80
Figura 30. La expresión de InvF-FLAG se detecta a un bajo nivel en la mutante mutante Δ <i>ssrB</i> , pero no en la cepa WT.....	82
Figura 31. La expresión de la fusión <i>invF-cat</i> se detecta a un bajo nivel en la mutante Δ <i>ssrB</i> , pero no en la cepa WT.....	83
Figura 32. Los genes de SPI-1 se des-reprimen sólo parcialmente en ausencia de SlyA y SsrB en medio PCN.....	84
Figura 33. La sobre-expresión de SsrB reprime la expresión de <i>fliC</i> , <i>fliA</i> y <i>flhD</i>	87
Figura 34. SsrB interactúa con la región reguladora de <i>flhD</i> , pero no con la de <i>fliC</i> y <i>fliA</i>	88
Figura 35. La sobre-expresión o la ausencia de SsrB no afecta la movilidad de <i>S. Typhimurium</i>	89
Figura 36. El nivel de expresión de <i>fliC</i> es menor en ausencia de CsrA que cuando se sobre-expresa SsrB.....	91
Figura 37. Modelo propuesto para la regulación de <i>hilD</i> por SsrB.....	94

Figura 38. La expresión de los genes de SPI-1 es regulada por múltiples vías de represión.....	99
Figura 39. Esquema del modelo de regulación en cascada de los genes de SPI-1, SPI-2 y del flagelo, donde participa el sistema de dos componentes SsrA/B.	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.....	42
Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo	43
Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo	45
Tabla 4. Antibióticos y dosis empleadas en este trabajo	47
Tabla 5. Expresión de las fusiones transcripcionales <i>ssaG-cat</i> , <i>hilA-cat</i> , <i>hilD-cat</i> e <i>invF-cat</i> en muestras de cultivos de la cepa WT de <i>S. Typhimurium</i> SL1344 y su derivada mutante Δ <i>ssrB</i> crecidas en PCN.....	79

RESUMEN

La mayoría de los genes que *Salmonella enterica* requiere para la virulencia están agrupados en dos regiones cromosomales denominadas islas de patogenicidad de *Salmonella* 1 y 2 (SPI-1 y SPI-2). Los genes de SPI-1 son necesarios para que *Salmonella* invada las células del epitelio intestinal, mientras que los genes de SPI-2 son requeridos principalmente para su replicación y supervivencia dentro de macrófagos. *In vivo*, la expresión de los genes de SPI-1 se induce cuando *Salmonella* se encuentra en el intestino; *in vitro*, su expresión se induce cuando esta bacteria se encuentra al final de la fase exponencial de crecimiento en el medio rico en nutrientes Luria-Bertani (LB). Cuando *Salmonella* se encuentra dentro de macrófagos, o cuando crece en condiciones específicas *in vitro*, como en medio mínimo o en una fase estacionaria tardía en medio LB, el sistema de dos componentes SsrA/B, codificado en SPI-2, induce la expresión de los genes de SPI-2. Interesantemente, en las condiciones que inducen la expresión de los genes de SPI-2, la expresión de los genes de SPI-1 y del flagelo se reprime, sugiriendo una conexión en la regulación de los genes de SPI-2, SPI-1 y del flagelo. En este trabajo se muestra que el sistema de dos componentes SsrA/B regula negativamente la expresión de los genes de SPI-1 y del flagelo. El regulador de respuesta SsrB controla la expresión de los genes de SPI-1 a tres diferentes niveles, reprimiendo directamente la expresión de *csrB*, *hilD* y *hilA*, los cuales codifican para reguladores positivos de los genes de SPI-1. Los resultados indican que SsrB se une a una secuencia localizada entre las posiciones -37 y +6 del promotor de *hilD*, lo que sugiere que esta unión bloquea el acceso de la RNA polimerasa a este promotor. SsrB también reprime directamente la expresión de los genes *flhDC*, que codifican para el complejo FlhDC, el cual induce en cascada la expresión de los genes flagelares. En conclusión, estos resultados indican que el sistema de dos componentes SsrA/B actúa como un regulador global que controla, positiva o negativamente, la expresión de genes adquiridos durante la evolución de la patogenicidad de *Salmonella*, como los genes de SPI-1 y SPI-2, y también regula a genes pre-existentes a la propia adquisición de SPI-1 y SPI-2, como son los genes *csrB* y *flhDC*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El género *Salmonella* y su importancia

El género *Salmonella*, de la familia *Enterobacteriaceae*, comprende bacterias Gram-negativas anaerobias facultativas. Este género se divide en dos especies: (i) *Salmonella bongori*, que agrupa a bacterias comensales de animales de sangre fría, y (ii) *Salmonella enterica*, que a su vez se divide en seis subespecies: *enterica* (o subespecie I), *salamae* (o subespecie II), *arizonae* (o subespecie IIIa), *diarizonae* (o subespecie IIIb), *houtenae* (o subespecie IV) e *indica* (o subespecie V). En base a la especificidad antigénica del lipopolisacárido (antígeno O) y la estructura de la flagelina (antígeno H), más de 2600 serovares han sido distinguidos dentro de las diferentes subespecies de *S. enterica* (Brenner *et al.*, 2000; Tindall *et al.*, 2005; Coburn *et al.*, 2007). *S. enterica* agrupa a bacterias patógenas de humanos y animales que causan una variedad de enfermedades, que van desde infecciones gastrointestinales localizadas que producen diarrea, hasta infecciones sistémicas severas, como la fiebre tifoidea (Santos *et al.*, 2001; Haraga *et al.*, 2008). Muchos de los serovares de esta especie están adaptados a un hospedero, como es el caso de *S. enterica* serovares Typhi (*S. Typhi*) y Paratyphi (*S. Paratyphi*) que son patógenos exclusivos de humanos. En contraste, otros serovares no están adaptados a un hospedero y tienden a ser patógenos de diferentes especies de hospederos. Por ejemplo, *S. enterica* serovares Typhimurium (*S. Typhimurium*) y Enteritidis (*S. Enteritidis*) pueden causar diferentes tipos de enfermedades en diferentes hospederos (Uzzau *et al.*, 2000). En animales, *S. Typhimurium* puede ocasionar una infección intestinal localizada o una infección sistémica similar a la fiebre tifoidea, lo que ha permitido su empleo como modelo en infecciones a ratones, bovinos o a cultivos de células epiteliales para el estudio de los mecanismos moleculares por medio de los cuales *S. enterica* interactúa con las células del hospedero (Haraga *et al.*, 2008).

La infección por *S. enterica* es una de las causas más comunes de enfermedades transmitidas por alimentos (intoxicación alimentaria) en el mundo (Callaway *et al.*, 2008; Fàbrega and Vila, 2013) y es la principal causa de enfermedades diarreicas en países en desarrollo (Kariuki *et al.*, 2006; Kabir *et al.*, 2012). La gastroenteritis (salmonelosis) es causada por serovares no tifoideos, siendo los más frecuentes *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, los cuales son transmitidos a humanos principalmente al consumir carne de origen animal, agua y huevos contaminados (Mead *et al.*, 1999; Callaway *et al.*, 2007; Gantois *et al.*, 2008). La OMS reporta 93.8 millones de casos de gastroenteritis y diarreas debidas a salmonelosis no tifoideas, que producen 155,000 muertes anuales (Bhan *et al.*, 2005; Majowicz *et al.*, 2010), *S. Typhimurium* es el serovar más frecuentemente aislado en Norte América, mientras que *S. Enteritidis* es el más frecuente en la Unión Europea (Cogan and Humphrey, 2003; Callaway *et al.*, 2008). Por otro lado, la fiebre tifoidea es causada por *S. Typhi* y *S. Paratyphi* (Mead *et al.*, 1999). La OMS ha reportado que anualmente se producen de 16 a 21 millones de casos de fiebre tifoidea en humanos, que causan de 200,000 a 600,000 muertes alrededor del mundo (Edelman and Levine, 1986; Merican, 1997).

La gastroenteritis es una infección que generalmente permanece localizada en el intestino y nodos linfáticos mesentéricos (Raffatellu *et al.*, 2006). Los pacientes generalmente presentan dolor abdominal, calambres, diarrea con o sin sangre asociada con inflamación del intestino grueso, y muy frecuentemente náusea y vómito (Coburn *et al.*, 2007). El período de incubación es corto (6 a 72 h) y es seguido por un episodio corto de enfermedad (<10 días), sugiriendo que la infección es combatida eficientemente por la respuesta inmune adaptativa del hospedero (Raffatellu *et al.*, 2006; Fàbrega and Vila, 2013). En cambio, la fiebre tifoidea es una infección sistémica severa en la que *Salmonella* coloniza el hígado, bazo y médula ósea, aparte del intestino y los nodos linfáticos mesentéricos. Además, la fiebre tifoidea se caracteriza por un período de incubación considerablemente largo (entre 5 y 9 días) y una duración de los síntomas más larga (la fiebre persiste por aproximadamente 3 semanas) que el observado en

pacientes infectados con serovares de *Salmonella* no tifoideos (Raffatellu *et al.*, 2006). El primer signo de infección es la enterocolitis con diarrea, frecuentemente acompañado de síntomas no específicos como dolor de cabeza, escalofríos, anorexia, debilidad, vértigo, dolor muscular y/o calambre abdominal. Generalmente, estos síntomas desaparecen antes de que el clásico indicador de fiebre tifoidea aparezca: dolor abdominal y fiebre (Jones and Falkow, 1996).

La diferencia en la respuesta del hospedero y las manifestaciones clínicas entre la gastroenteritis y la fiebre tifoidea sugieren que los serovares que causan cada una de estas enfermedades lo hacen a través de diferentes mecanismos (Raffatellu *et al.*, 2006).

1.2. Factores de virulencia de *Salmonella*

La gravedad de una infección por *Salmonella* depende del tipo y estado del hospedero, así como del grado de patogenicidad de la bacteria. Esto último determinado por los factores de virulencia, los cuales utiliza para interaccionar con su hospedero y evadir los diferentes mecanismos de defensa que se le van presentando. Entre los factores de virulencia se incluyen toxinas, fimbrias, flagelos, sistemas de secreción y proteínas efectoras. Algunos de los genes que codifican para estos factores se encuentran dentro de islas de patogenicidad mientras que otros se localizan en el cromosoma (Marcus *et al.*, 2000; Caburn *et al.*, 2007; Fàbrega and Vila, 2013).

1.2.1. Sistemas de secreción tipo III (SST3)

Los sistemas de secreción tipo III (SST3) son organelos complejos compuestos por más de 20 proteínas que son utilizados por diversas bacterias Gram negativas patógenas para inyectar una serie de proteínas bacterianas, llamadas efectoras, dentro de la célula hospedera (Cornelis, 2006; Galán and Wolf-Watz, 2006; Marlovits and Stebbins, 2010). Se ha propuesto que estos sistemas derivan del flagelo, pues muchas de las proteínas que lo conforman

presentan homología con las proteínas del aparato de exportación flagelar (Van Gijsegem *et al.*, 1995; Pallen *et al.*, 2005). La maquinaria del SST3 está compuesta de un cuerpo basal anclado a la membrana bacteriana y una aguja externa, a través de la cual son secretadas las proteínas efectoras (Kubori *et al.*, 1998; Cornelis, 2006). El cuerpo basal consiste de un anillo interno, un canal que atraviesa la zona periplásmica y un anillo externo. La liberación de efectores dentro del citoplasma de la célula hospedera requiere de tres proteínas adicionales, llamadas translocadoras, las cuales forman un poro en la membrana de la célula hospedera (Cornelis, 2006; Moest and Méresse, 2013). Una de las proteínas conservadas en este aparato es la ATPasa, cuya integridad es esencial para el funcionamiento del sistema (Woestyn *et al.*, 1994). Mientras que todos los SST3 son estructuralmente similares, los efectores secretados por estos sistemas son extremadamente diferentes (Samudrala *et al.*, 2009) y muestran un gran repertorio de actividades bioquímicas que modulan la función de moléculas reguladoras cruciales del hospedero (Mota and Cornelis, 2005).

Salmonella enterica cuenta con dos diferentes SST3 codificados en distintas regiones del cromosoma, conocidas como islas de patogenicidad de *Salmonella* 1 (Galán, 1999) y 2 (Hensel *et al.*, 1998) (SPI-1 y SPI-2, respectivamente). Estos sistemas difieren tanto en el tiempo de expresión como en función. Mientras que el SST3-1 (codificado en SPI-1) es requerido para iniciar la infección intestinal, al translocar efectores que permiten la invasión de células epiteliales del intestino del hospedero, el SST3-2 (codificado en SPI-2) permite el establecimiento de la infección sistémica, al ser requerido principalmente para la replicación de *Salmonella* dentro de las células de varios órganos del hospedero (Hansen-Wester and Hensel, 2001; Haraga *et al.*, 2008; Moest and Méresse, 2013). No obstante, al parecer existen algunos períodos de secreción que se superponen, como en la biogénesis de las SCVs, donde participan efectores de ambos sistemas (Hernandez *et al.*, 2004; Drecktrah *et al.*, 2005; Lawley *et al.*, 2006; Brawn *et al.*, 2007).

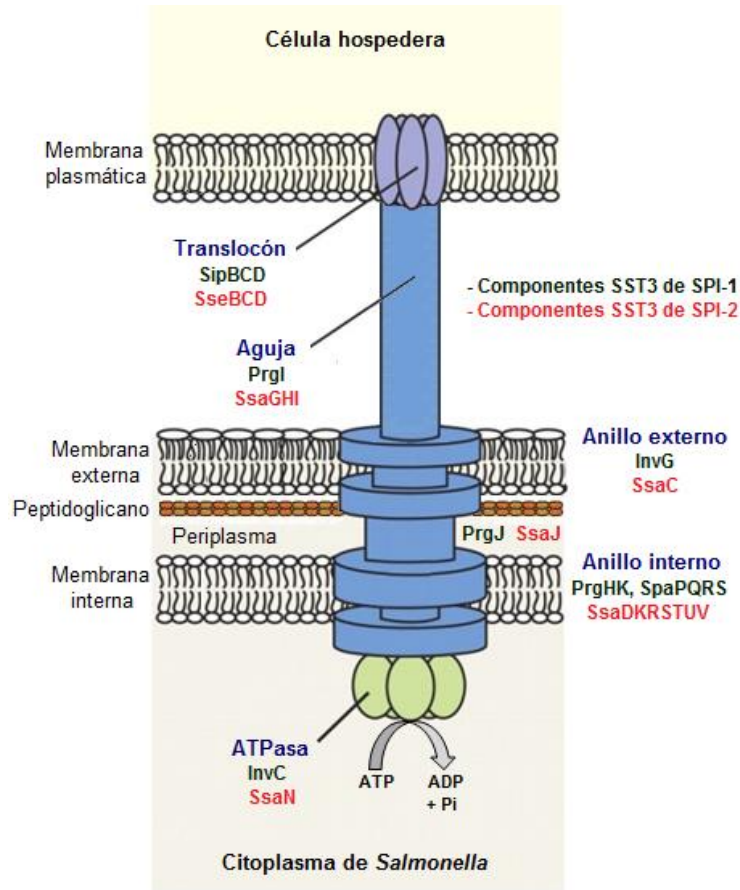


Figura 1. Esquema del sistema de secreción tipo III de *Salmonella*. El SST3 está formado por un cuerpo basal, que consiste en un par de anillos que abarcan la membrana externa, la capa de peptidoglicano y la membrana externa. En este cuerpo basal se ancla la aguja, que termina en el translocón. En la cara del citoplasma bacteriano está la ATPasa. Se señalan los componentes conocidos que forman el SST3 de SPI-1 (en negro) y el SST3 de SPI-2 (en rojo) (Adaptado de Büttner and He, 2009).

1.2.2. Islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs)

La mayoría de los genes necesarios para la virulencia de *Salmonella* están codificados en regiones particulares del genoma conocidas como islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs, por “*Salmonella* Pathogenicity Islands”) (Marcus *et al.*, 2000; Schmidt and Hensel, 2004). Las primeras islas de patogenicidad (PAIs) fueron descritas en *Escherichia coli*, posteriormente se descubrió que otras bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas

también contenían estos segmentos de DNA en sus genomas. Una PAI se identifica del resto del genoma por contener genes que codifican para uno o más factores de virulencia (Hacker and Kaper, 2000). Entre las características que presentan estas islas se encuentran las siguientes:

- Están presentes en el genoma de organismos patógenos, mientras que no lo están en genomas de organismos no patógenos aunque sean incluso de la misma especie.
- La mayoría de las PAIs abarcan una región de DNA de al menos 10-20 kb y como máximo 200 kb. Cuando las regiones de DNA que codifican para factores de virulencia son menores a 10 kb, se les conoce como isletas de patogenicidad.
- Las PAIs frecuentemente consisten en regiones de DNA que difieren en su contenido de G+C, lo que refleja la obtención de estas islas a través de transferencia horizontal de genes.
- Estas islas generalmente se encuentran flanqueadas por pequeñas secuencias directas repetidas (DR), las cuales se generan después de la integración de la isla a regiones específicas del genoma bacteriano por recombinación sitio-específica.
- Están frecuentemente asociadas a genes de RNA de transferencia (RNA_t), pues los loci de RNA_t actúan como sitios de integración de DNA foráneo.
- Contienen genes que codifican para factores de movilidad como son integrasas, transposasas o secuencias de inserción (IS), lo que presumiblemente indica su origen a partir de un bacteriófago o plásmido conjugativo (Hacker and Kaper, 2000; Schmidt and Hensel, 2004).

Hasta el momento se han descrito 22 diferentes SPIs, de las cuales algunas están conservadas en el género *Salmonella*, mientras que otras son específicas de ciertos serovares (Schmidt and Hensel, 2004; Fookes *et al.*, 2011). SPI-1 y SPI-2 son las mejor caracterizadas y son las únicas que codifican un SST3. Los genes

de SPI-1 y SPI-2 codifican para factores de virulencia necesarios para la invasión a las células epiteliales y replicación dentro de los macrófagos, respectivamente (Galán, 1999; Hansen-Wester and Hensel, 2001).

1.2.2.1. SPI-1

SPI-1 se encuentra en todos los miembros del género *Salmonella* y comprende una región de aproximadamente 40 kb que está insertada entre los genes *fhIA* y *mutS* (Ochman *et al.*, 1996; Hensel 2004). Esta isla contiene 39 genes, los cuales codifican para un SST3, proteínas efectoras, chaperonas y para varios reguladores transcripcionales (SprB, HilC, HilD, HilA e InvF). Muchos de estos genes se localizan en tres probables operones multicistronicos (*prg/org*, *sic/sip* e *inv/spa*). El resto son genes que se expresan como unidades monocistronicas (*avrA*, *sprB*, *hilC*, *hilD*, *hilA*, *iagB*, *sptP* e *invH*) (Altier, 2005; Rhen and Dorman, 2005). Los operones *prg/org* e *inv/spa* codifican para el complejo-aguja del SST3 mientras que en el operón *sic/sip* se encuentran codificadas las proteínas efectoras (AvrA, SipA, y SptP) y translocadoras (SipB, SipC y SipD) (Lostroh and Lee, 2001). En general, los efectores codificados en esta isla promueven la reorganización de las proteínas del citoesqueleto de la membrana de las células epiteliales del lumen intestinal, lo que permite la internalización de *Salmonella* (Haraga *et al.*, 2008). No todos los genes de esta isla son requeridos para el funcionamiento del SST3, ya que un grupo de 4 genes localizados en el límite de la isla codifica para un sistema de consumo de hierro y no son requeridos para la invasión (Zhou *et al.*, 1999a; Gal-Mor and Finlay, 2006).

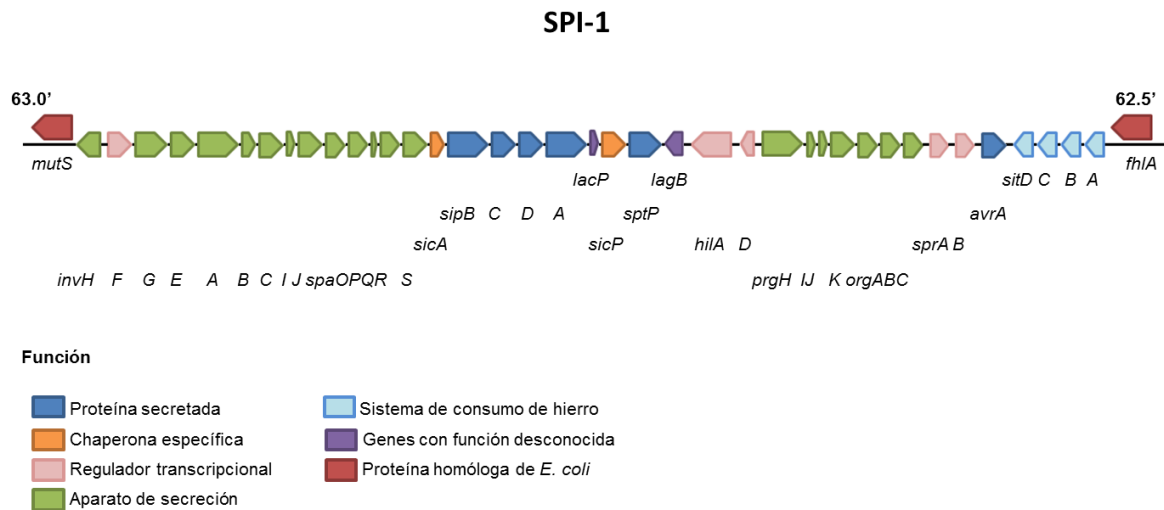


Figura 2. Organización genética de SPI-1. Se indica el orden y la nomenclatura de los genes codificados en esta isla.

1.2.2.2. SPI-2

SPI-2 comprende una región de aproximadamente 40 kb insertada entre los genes *tRNA valV* y *ORF242*. Esta isla contiene 44 genes y se ha dividido en dos segmentos (Hensel *et al.*, 1999a). Un fragmento de 15 kb, presente en *S. bongori* y *S. enterica*, contiene genes que codifican para componentes estructurales de una tetrionato reductasa (*ttrABC*) y su sistema regulador de dos componentes (*ttrRS*), además de 7 ORFs de función desconocida; todos estos genes no son importantes para la virulencia (Hensel *et al.*, 1999b). El otro fragmento, de 25 kb, está presente únicamente en *S. enterica*, y es el requerido para la infección sistémica ya que contiene los genes que codifican para un segundo SST3, proteínas efectoras y chaperonas, así como para el sistema de regulación de dos componentes SsrA/B (Hansen-Wester and Hensel, 2001; Hensel 2004). Todos estos genes de virulencia se localizan en tres probables operones multicistrónicos (*ssa1*, *ssa2* y *sse*) y en un operón bicistrónico (*ssrAB*) (Fass and Groisman, 2009). En general, los genes de SPI-2 que son importantes para la virulencia se pueden dividir en 4 tipos: *ssa*, codifican el aparato del SST3-2; *sse*, codifican los efectores; *ssc*, codifican las chaperonas; y *ssr*, codifican los reguladores (Kuhle and Hensel,

2004). Las proteínas efectoras codificadas en esta isla son SseF y SseG, mientras que las proteínas translocadoras son SseB, SseC y SseD (Moest and Méresse, 2013). En general, esta isla le permite a *Salmonella* sobrevivir y replicarse dentro de las células hospederas (células epiteliales y macrófagos) debido a las diferentes funciones de sus proteínas efectoras (Haraga *et al.*, 2008).

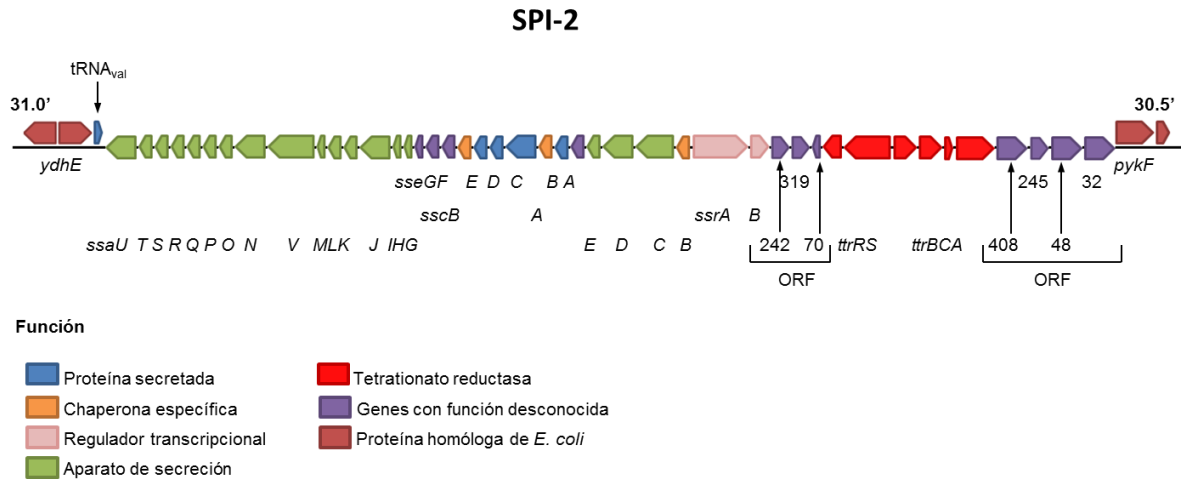


Figura 3. Organización genética de SPI-2. Se indica el orden y la nomenclatura de los genes codificados en esta isla.

1.2.3. Flagelo

El tipo más común de movilidad bacteriana se da a través del flagelo, un largo filamento helicoidal o propela, que es impulsado por un motor rotatorio embebido en la membrana celular (Macnab, 1999). En diversas bacterias, el flagelo provee una ventaja competitiva al permitirles nadar hacia los nutrientes y alejarse de ambientes dañinos. El flagelo procarionte es una maquinaria molecular compleja que consiste de tres distintas estructuras principales: el cuerpo basal, el gancho y el filamento. El cuerpo basal está embebido a la superficie membranal de la célula y actúa como un motor rotatorio, el cual es impulsado por la fuerza protón-motriz transmembranal. Esta rotación generada en el cuerpo basal, es transmitida por medio del gancho al filamento helicoidal, el cual actúa como una hélice que empuja la célula bacteriana (Aizawa, 1996).

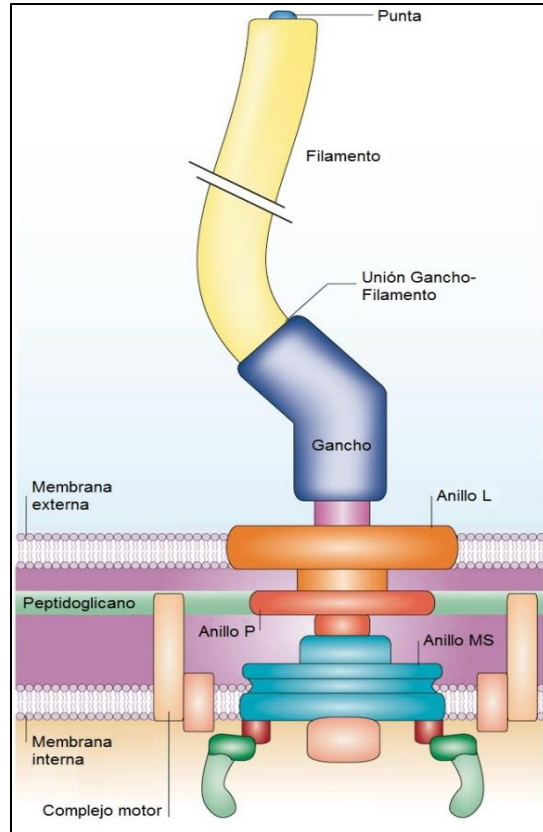


Figura 4. Estructura del flagelo bacteriano. En el esquema se muestran los diferentes componentes de la estructura del flagelo (Adaptada de Pallen and Matzke, 2006).

La célula bacteriana ensambla en primer lugar el cuerpo basal en la superficie de la membrana celular. Este cuerpo está compuesto por 20 proteínas que actúan como sostén y un conducto secretor de componentes proteicos para el resto de la estructura flagelar. Las subunidades del gancho son secretadas a través del cuerpo basal y se ensambla sobre la punta de la estructura de la barra axial del cuerpo basal. Una vez que el gancho se ha ensamblado, cientos de subunidades de la proteína que forma el filamento, la flagelina, son secretadas a través de la estructura de gancho-cuerpo basal y se ensambla dentro del filamento sobre el gancho (Aizawa, 1996; Macnab, 2003).

1.3. Mecanismo de patogénesis

Salmonella enterica entra al hospedador por vía oral a través de agua y alimentos contaminados (Haraga *et al.*, 2008). El primer obstáculo al que se enfrenta la bacteria es al pH ácido del estómago, sin embargo *Salmonella* cuenta con una respuesta adaptativa de tolerancia ácida (ATR) que promueve su supervivencia en el estómago (Garcia-del Portillo *et al.*, 1993). En esta fase de la infección la bacteria requiere ser móvil (contar con flagelos funcionales) para poder llegar al epitelio intestinal (Stecher *et al.*, 2004). Después de ingresar al intestino delgado, *Salmonella* atraviesa la capa de la mucosa intestinal y evade la acción de enzimas digestivas, sales biliares, IgA secretora, péptidos antimicrobianos y otras defensas del sistema inmune innato para poder ganar acceso al epitelio subyacente (Prouty *et al.*, 2004; Haraga *et al.*, 2008). Posteriormente, *Salmonella* se adhiere a la superficie apical de las células, utilizando diferentes tipos de adhesinas fimbriales, como las fimbrias tipo I (Bäumler *et al.*, 1996; Van Der Velden *et al.*, 1998). *Salmonella* tiene la habilidad de invadir enterocitos no fagocíticos en el epitelio intestinal, sin embargo, entra preferencialmente a través de las células con micropliegues (células M) (Jones *et al.*, 1994). Las células M son células epiteliales sin borde en cepillo, cubren las placas de Peyer y están especializadas en el transporte de antígenos desde el lumen intestinal a tejidos linfoides de las placas de Peyer (Kraehenbuhl and Neutra, 2000; Kucharzik *et al.*, 2000).

Después de que *Salmonella* se adhiere a la superficie apical de las células epiteliales del intestino, se estimula la rápida translocación de una serie de proteínas efectoras bacterianas, que incluyen a SipA, SipC, SopE, SopE2, SopB/SigD y SptP, hacia el citoplasma de la célula hospedera, a través del SST3 codificado en SPI-1 (Raffatellu *et al.*, 2005; Schlumberger and Hardt, 2005; McGhie *et al.*, 2009). Los efectores SipA y SipC son proteínas de unión a actina con un papel en la localización y polimerización de la actina cerca de la bacteria adherida, lo que promueve la invasión (Hayward and Koronakis, 1999; Zhou *et al.*, 1999b; McGhie *et al.*, 2001; Higashide *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2005; Perrett and

Jepson, 2009), mientras que SopE y SopE2 son factores de intercambio de nucleótido de guanina (GEFs) que activan directamente a las Rho GTPasas Rac1 y Cdc42 (Hardt *et al.*, 1998; Rudolph *et al.*, 1999; Stender *et al.*, 2000; Friebe *et al.*, 2001), modulando el ensamblaje de la actina en el citoesqueleto a través del complejo Arp2/3, el cual inicia la polimerización de actina y ramifica filamentos de actina (Hardt *et al.*, 1998; Stender *et al.*, 2000). De manera similar, SopB/SigD es una fosfatidilinositol fosfatasa que contribuye al remodelamiento de la actina a través de la activación de Rho GTPasas (Zhou *et al.*, 2001; Patel and Galán, 2006). La reorganización de proteínas del citoesqueleto altera el epitelio normal de borde en cepillo e induce la formación de estructuras en las membranas, denominadas “membrane ruffles”, que facilitan la invasión de *Salmonella* a las células epiteliales, produciéndose así la infección intestinal (Haraga *et al.*, 2008).

Simultáneamente, se induce una respuesta secretora en el epitelio intestinal que inicia con el reclutamiento y trans migración de fagocitos desde el espacio submucoide al lumen intestinal. SopB/SigD, SopE y SopE2 han sido implicados en mediar la inflamación intestinal al comprometer la integridad de la barrera intestinal a través de la modulación de las uniones íntimas (Boyle *et al.*, 2006) y a través de la inducción de varias vías de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), que resulta en la activación de los factores de transcripción de la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear κ B (NF- κ B). Estos factores dirigen la producción de citosinas pro-inflamatorias, como la IL-8, que estimula la trans migración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) (Patel and Galán, 2006; Bruno *et al.*, 2009). Además, SopB/SigD estimula la secreción de Cl^- (Zhou *et al.*, 2001). Aunado a los efectores del SST3-1, existen otros factores de virulencia no relacionados con las SPIs que también contribuyen en la inflamación. Estas estructuras bacterianas, como el flagelo y la fimbria curli, son identificadas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que estimulan las vías de inflamación innata después de su reconocimiento por sus correspondientes receptores tipo Toll (TLR) (Zeng *et al.*, 2003). En conjunto, estas respuestas resultan en una permeabilidad transepitelial incrementada, un flujo de PMN y una acumulación de fluido en el lumen intestinal, culminando en los característicos

síntomas de diarrea asociados con infección gastrointestinal (Haraga *et al.*, 2008; Fàbrega and Vila, 2013). Después de la entrada de *Salmonella*, la arquitectura normal del borde en cepillo de la célula hospedera es restaurada a través de la proteína activadora de GTPasa (GAP), SptP, la cual antagoniza a SopE, SopE2 y SopB/SigD (Fu and Galán, 1999). Esto también resulta en una disminución de la respuesta inflamatoria, en donde los efectores SspH1 y AvrA también contribuyen, al inhibir la activación de NF- κ B (Collier-Hyams *et al.*, 2002; Haraga and Miller, 2003). Esta etapa de la infección se ilustra en la figura 5A.

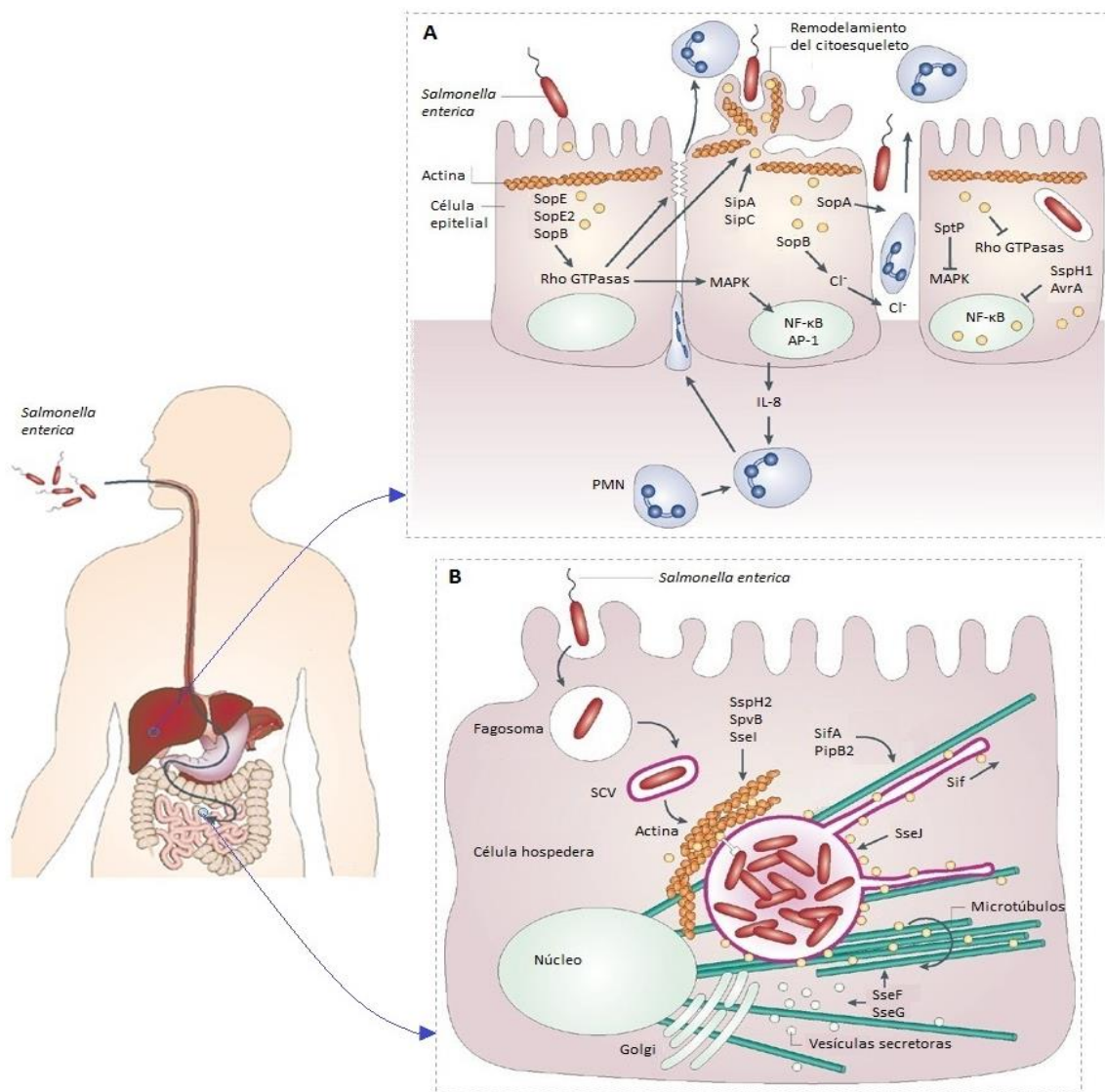


Figura 5. Modelo de patogénesis de *Salmonella enterica*. *Salmonella enterica* entra al hospedador por vía oral a través de agua o alimentos contaminados. (A) En el intestino delgado,

después de establecer contacto con las células epiteliales del intestino, *Salmonella* ensambla el SST3-1 por medio del cual transloca diferentes efectores al citoplasma eucariótico. Estos efectores promueven el remodelamiento del citoesqueleto de las células epiteliales, lo que facilita la entrada de *Salmonella* a estas células. Paralelamente se induce una respuesta inflamatoria local. (B) Después de cruzar el epitelio, los serovares de *Salmonella* asociados con infección sistémica invaden macrófagos intestinales y dentro de ellos se van a localizar en las SCVs. En esta etapa se translocan otra serie de efectores a través del SST3-2, los cuales promueven la supervivencia y replicación de la bacteria dentro de las SCVs, para posteriormente diseminarse a otros órganos, principalmente hígado y bazo. Ver texto para más detalles (Adaptado de Haraga *et al.*, 2008).

La capacidad de *Salmonella* de sobrevivir dentro de sus células hospederas, como es el caso de macrófagos, se basa en su habilidad de evitar las rutas degradativas intracelulares, lo que posteriormente le permite establecer un nicho replicativo, que conlleva a una propagación sistémica en el organismo (Fields *et al.*, 1986; Cirillo *et al.*, 1998). Para esto, después de entrar a la célula hospedera, *Salmonella* reside dentro de un fagosoma espacioso que rápidamente madura a un compartimento distinto conocido como “*Salmonella* containing vacuole” (SCV) (Steele-Mortimer *et al.*, 1999). La acidificación de la SCV, combinado con la concentración limitada de cationes divalentes y fosfato, estimula la expresión de un segundo sistema SST3 codificado dentro de SPI-2 (Cirillo *et al.*, 1998; Deiwick *et al.*, 1999; Garmendia *et al.*, 2003), el cual *Salmonella* utiliza para facilitar la translocación de al menos 20 proteínas efectoras a través de la membrana de la SCV hacia el citosol de la célula hospedera (Haraga *et al.*, 2008; McGhie *et al.*, 2009). Estos efectores tienen un papel en manipular las vías de tráfico en la célula hospedera y en localizar la SCV en un sitio favorable para la proliferación de *Salmonella* (Uchiya *et al.*, 1999; Beuzón *et al.*, 2000; Boucrot *et al.*, 2005). Los efectores SigD y SsaB modifican el tráfico vesicular para que la vacuola escape de la vía de degradación normal, lo que inhibe la fusión de las SCVs con los lisosomas, evitando con esto su exposición a especies reactivas tóxicas de oxígeno (Haraga *et al.*, 2008). Después que las SCVs maduran y se acumula actina a su alrededor por acción de SspH2, SpvB y Ssel (para el mantenimiento de la integridad de la membrana de la vacuola), la vacuola migra hasta una localización perinuclear, lo cual podría darle una ventaja en términos de

adquisición de nutrientes. En esta etapa participan SseF y SseG, que causan agregados de microtúbulos adyacentes a la SCV y dirigen el tráfico vesicular derivado del aparato de Golgi hacia la vacuola. Una vez que la SCV está correctamente localizada, la bacteria comienza a replicarse y los efectores SifA y PipB2 inducen la formación filamentos llamados *Salmonella*-induced filament (Sif), que se originan en la SCV y se extienden a través de la célula. Estos filamentos permiten el incremento de tamaño de la SCV (Brumell and Grinstein, 2004; Bakowski *et al.*, 2008; Haraga *et al.*, 2008). De esta forma la bacteria sobrevive y prolifera dentro de los macrófagos, y dentro de estos puede diseminarse a otros sitios anatómicos, como el hígado y bazo (Haraga *et al.*, 2008). En la figura 5B se esquematiza esta etapa de la infección.

1.4. Regulación de la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2

Debido a que SPI-1 y SPI-2 contienen genes que son fundamentales para la invasión y supervivencia de *Salmonella* en el hospedero, la regulación de su expresión es crucial. En esta regulación participan un gran número de reguladores, codificados dentro de las islas o fuera de ellas, que controlan la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 de manera positiva o negativa (Fàbrega and Vila, 2013).

1.4.1. Estímulos ambientales que inducen la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2

La supervivencia de *Salmonella* dentro de su hospedero exige que la bacteria responda inmediatamente al entorno del nicho en el que se encuentra. Para esto, *Salmonella* induce la expresión de los genes adecuados que le permitan contrarrestar condiciones extracelulares o intracelulares que podrían ser adversas para su supervivencia (Lee *et al.*, 2000). Se ha reportado que los genes de SPI-1 y SPI-2 se expresan *in vivo* y en condiciones de laboratorio en respuesta a distintas condiciones ambientales (Bustamante *et al.*, 2008; Fass and Groisman,

2009; Martínez *et al.*, 2011; Golubeva *et al.*, 2012). Por ejemplo, en el lumen intestinal se expresan los genes de SPI-1 y SPI-2 (Brown *et al.*, 2005), aunque no se sabe si esto ocurre al mismo tiempo; mientras que, cuando *Salmonella* está dentro de las vacuolas de células hospederas únicamente se induce la expresión de los genes de SPI-2, mientras que la expresión de los genes de SPI-1 se reprime (Eriksson *et al.*, 2003).

Entre las principales condiciones ambientales que favorecen la expresión de los genes de SPI-1 se encuentran la alta osmolaridad y el pH ligeramente alcalino, lo cual podría encontrar *Salmonella* en el lumen intestinal (Altier, 2005; Jones, 2005). Por otro lado, entre las señales que se han definido que inducen la expresión de los genes de SPI-2 se encuentran la limitación de fosfato inorgánico (P_i) o magnesio y el pH ácido, condiciones que puede encontrar *Salmonella* cuando está en las vacuolas de las células del hospedero (Löber *et al.*, 2006).

In vitro, los genes de SPI-1 se expresan cuando *Salmonella* crece en un medio rico en nutrientes, como es el medio LB (Lundberg *et al.*, 1999), debido principalmente a la alta osmolaridad que presenta este medio (Altier, 2005). Asimismo, los genes de SPI-2 se expresan cuando *Salmonella* crece en medios mínimos que contienen concentraciones bajas de fosfato, calcio y magnesio (Deiwick *et al.*, 1999).

Recientemente, en nuestro grupo se encontró que tanto los genes de SPI-1 como los genes de SPI-2 se pueden expresar en el medio LB, pero esto ocurre en diferentes fases del crecimiento de *Salmonella* (Bustamante *et al.*, 2008), lo cual se describe con mayor detalle más adelante.

1.4.2. Reguladores positivos y negativos de SPI-1

Varios reguladores han sido involucrados en el control de la expresión de los genes de SPI-1 (Golubeva *et al.*, 2012). HilA, regulador transcripcional codificado en SPI-1, es un miembro de la familia de reguladores transcripcionales OmpR/ToxR, el cual activa directamente la expresión de los operones *prg/org* e

inv/spa. De esta forma, se induce la expresión de otro regulador transcripcional codificado en esta isla, InvF, miembro de la familia de AraC/XylS. Este regulador induce en cascada la expresión del operón *sic/sip*, lo que conlleva a la expresión del resto de los genes de SPI-1 (Altier, 2005). HilD es otro regulador transcripcional codificado en SPI-1 que pertenece a la familia AraC/XylS. Regula positivamente la expresión de *hilA*, de manera directa o a través de un circuito de regulación que conforma con HilC y RtsA, también miembros de la familia AraC/XylS. Cada uno de estos reguladores es capaz de inducir independientemente la expresión de *hilD*, *hilC* y *rtsA*, así como de *hilA* (Ellermeier *et al.*, 2005). HilD, HilC y RtsA se unen a las regiones promotoras de *hilD*, *hilC*, *rtsA* y *hilA*, contrarrestando el silenciamiento por H-NS (Olekhovich and Kadner, 2002; Schechter *et al.*, 2003; Olekhovich and Kadner, 2007). En este circuito HilD es el regulador dominante en el sistema, mientras que HilC y RtsA amplifican la señal (Ellermeier *et al.*, 2005). Por lo tanto, la expresión de los genes de SPI-1 se induce mediante una cascada de regulación conformada principalmente por los reguladores HilD, HilA e InvF (Golubeva *et al.*, 2012).

Las proteínas asociadas al nucleóide (NAPs) afectan el superenrollamiento del DNA, lo que las hace capaces de regular la expresión genética (Dillon and Norman, 2010). H-NS y Hha son dos reguladores que pertenecen a este grupo. H-NS reprime la expresión de *hilA*, *hilD*, *hilC* y *rtsA* (Olekhovich and Kadner, 2006; Olekhovich and Kadner, 2007), mientras que Hha reprime únicamente a *hilA*, *hilC* y *rtsA* (Fahlen *et al.*, 2001; Olekhovich and Kadner, 2007). Hu, IHF y Fis también son NAPs, las cuales son importantes para la expresión de los genes de SPI-1 (Altier, 2005, Fass and Groisman, 2009). PhoP/PhoQ y SirA/BarA forman parte de los sistemas reguladores globales de dos componentes. Se ha reportado que dentro de la SCV, PhoP puede regular negativamente a *hilA*, reprimiendo así la expresión de los genes de SPI-1 (Pegues *et al.*, 1995; Bajaj *et al.*, 1996). Por otro lado, el sistema SirA/BarA induce la expresión de los genes de SPI-1 al activar la expresión de CsrB y CsrC, dos moléculas de RNA pequeños no codificados, que secuestran a la proteína de unión a RNA, CsrA (Martínez *et al.*, 2011). CsrB tiene 18 sitios de unión a CsrA, mientras que CsrC tiene 9 sitios (Liu *et al.*, 1997;

Weilbacher *et al.*, 2003). CsrA regula post-transcripcionalmente la expresión de *hilD*, uniéndose a la secuencia Shine-Dalgarno del RNAm de *hilD*, evitando así su traducción (Martínez *et al.*, 2011). Otro sistema de dos componentes que participa en la regulación de los genes de SPI-1 es OmpR/EnvZ, el cual se ha propuesto que regula a HilD post-transcripcionalmente. El sistema PhoR/PhoB induce la expresión de los genes *fimYZ*, estos a su vez activan la expresión de HilE, que reprime la expresión de los genes de SPI-1 cuando se une directamente a HilD, inactivando a este regulador. En contraste, el regulador flagelar FliZ regula positivamente la expresión de HilA, lo que activa la expresión de los genes de SPI-1 (Altier, 2005; Ellermeier and Slauch, 2007; Fàbrega and Vila, 2013). La proteasa Lon (controlada por DnaK) regula negativamente a SPI-1 al degradar a HilD y HilC (Takaya *et al.*, 2005; Matsui *et al.*, 2008).

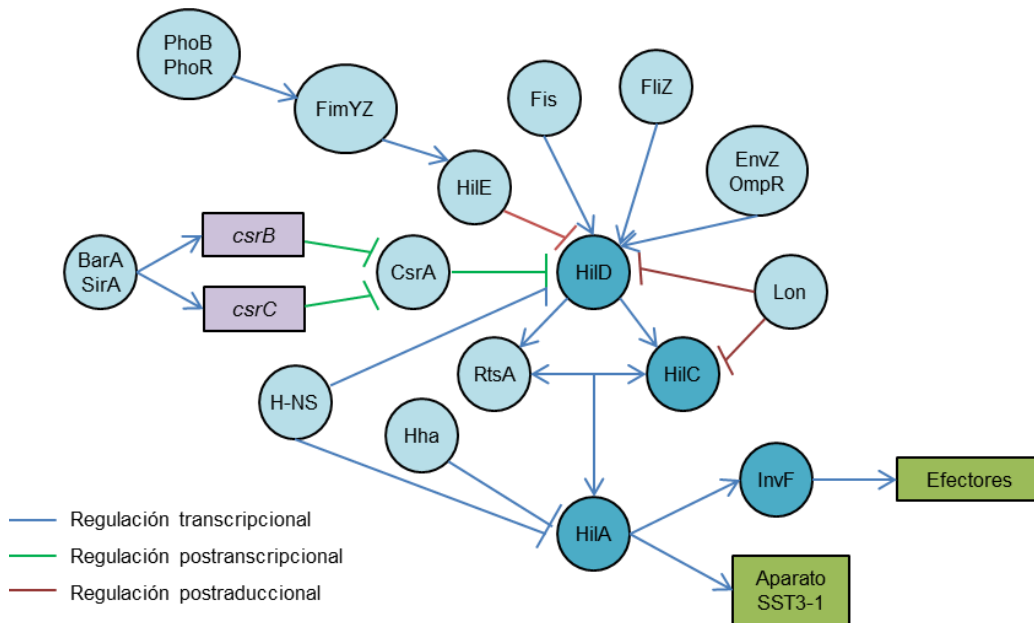


Figura 6. Regulación de la expresión génica de SPI-1. Se muestra la red de regulación para la expresión de los genes de SPI-1. En azul oscuro se indican los reguladores codificados dentro de SPI-1 y en azul claro los reguladores codificados fuera de esta isla. Las flechas continuas indican una regulación positiva, mientras que las flechas truncadas indican una regulación negativa.

1.4.3. Reguladores positivos y negativos de SPI-2

SPI-2 codifica su propio sistema regulador, el sistema de dos componentes SsrA/B, formado por la proteína sensora histidina cinasa SsrA y el regulador de respuesta SsrB. SsrB se une a los promotores de los operones *ssa1*, *ssa2* y *sse* de esta isla y es esencial para la expresión del SST3-2 y sus efectores, incluyendo aquellos codificados fuera de SPI-2. Por lo tanto, su función es crucial para la replicación intracelular de *Salmonella* durante una infección (Walthers *et al.*, 2007; Fass and Groisman, 2009). Los genes *ssrA* y *ssrB* forman el operón *ssrAB*, cuya expresión es controlada positivamente por diferentes reguladores globales, como los sistemas de dos componentes OmpR/EnvZ y PhoP/PhoQ, y los reguladores SlyA y Fis (Lee *et al.*, 2000; Bijlsma and Groisman, 2005; Fass and Groisman, 2009). PhoP controla los niveles de SsrA postranscripcionalmente, al parecer controlando la traducción del RNAm de *ssrA* (Bijlsma and Groisman, 2005). En el caso de OmpR, este regulador puede unirse directamente al promotor *ssrAB*, activando así la transcripción de estos genes. OmpR también puede actuar en conjunto con SsrB para activar la transcripción del efector Ssel, codificado fuera de SPI-2 (Deiwick *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2003; Garmendia *et al.*, 2003; Walthers *et al.*, 2007; Fass and Groisman, 2009). Fis se une a los promotores de los operones *ssr* y *ssa* activando así la transcripción de estos genes (Fass and Groisman, 2009). SlyA, regulador transcripcional de la familia MarR, se une directamente al promotor *ssrAB*, regulando positivamente la expresión de estos genes (Linehan *et al.*, 2005). Asimismo, en condiciones específicas de crecimiento, como cuando *Salmonella* se encuentra en una fase estacionaria tardía de crecimiento en el medio LB, la expresión del operón *ssrAB*, y así la expresión de los genes de SPI-2, se induce por el regulador HilD (Bustamante *et al.*, 2008), codificado en SPI-1.

Como para el caso de SPI-1, H-NS reprime la expresión de los genes de SPI-2 al unirse directamente a varios promotores de esta isla. La represión de H-NS sobre el operón *ssrAB* puede ser contrarrestada por el regulador transcripcional HilD, codificado en SPI-1, bajo ciertas condiciones, como en la fase

estacionaria en medio LB (Bustamante *et al.*, 2008), mientras que SsrB contrarresta la represión de H-NS sobre los demás genes de SPI-2 (Fass and Groisman, 2009, Walther *et al.*, 2007). Se ha reportado que otras dos NAPs, Hha y YdgT, también reprimen la transcripción de los genes de SPI-2 (Schechter *et al.*, 2003). Asimismo, SsrB se autorregula positivamente (Feng *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2004).

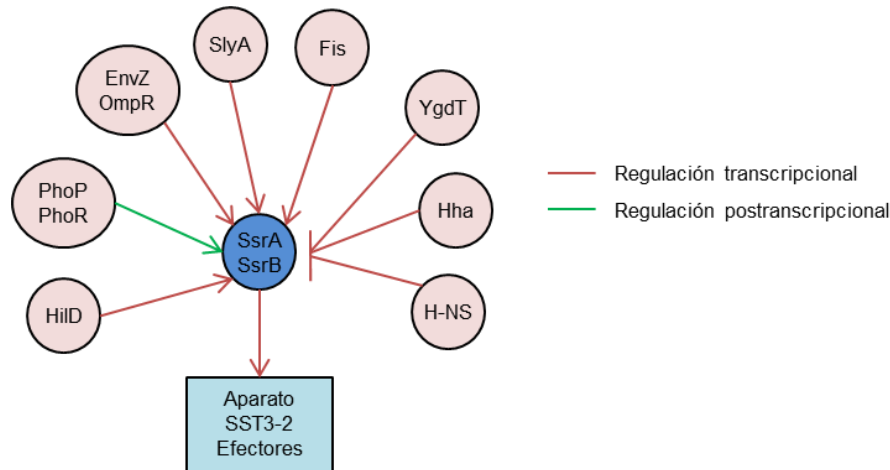


Figura 7. Regulación de la expresión génica de SPI-2. Se muestra la red de regulación para la expresión de los genes de SPI-2. En azul oscuro se indica al sistema de dos componentes SsrA/B, codificado en SPI-2, el cual controla positivamente la expresión de los genes de esta isla. En rosa claro se muestran los reguladores codificados fuera de SPI-2 que controlan la expresión del operón *ssrAB*, y que de esta manera regulan a los genes de esta isla. Las flechas continuas indican una regulación positiva, mientras que las flechas troncadas indican una regulación negativa.

1.4.3.1. Sistema de dos componentes SsrA/B

Los sistemas de dos componentes regulan la expresión de genes en respuesta a señales ambientales específicas y están frecuentemente involucrados en la regulación de la expresión de genes de virulencia en diferentes bacterias. En su forma más simple, un sistema de dos componentes contiene una cinasa sensora, frecuentemente una proteína de membrana que funciona en una señalización trans-membranal, y un regulador de respuesta, usualmente una

proteína de unión a DNA que regula directamente la transcripción (Hoch, 2000; Beier and Gross, 2006).

Como se mencionó anteriormente, el sistema de dos componentes SsrA/B controla la expresión de los genes de SPI-2 (Feng *et al.*, 2003; Garmendia *et al.*, 2003). Asimismo, SsrA/B también regula la expresión de algunos genes codificados fuera de esta isla, los cuales codifican principalmente para proteínas efectoras que son secretadas a través del SST3 codificado en SPI-2 o son componentes estructurales de este aparato de secreción (Garmendia *et al.*, 2003).

El arreglo del sistema SsrA/B difiere de muchos otros sistemas de dos componentes. SsrA es una cinasa híbrida compuesta por un dominio de unión a ATP, un dominio de fosforilación de histidina, un dominio de fosforilación o receptor, similar al presente en reguladores de respuesta, y un dominio histidilfosfotransferasa en su C-terminal (Feng *et al.*, 2003). La complejidad de estos dominios sugieren un mecanismo de fosforelevo, donde el grupo fosforilo es transferido mediante reacciones intramoleculares consecutivas de una histidina a un aspartato y de este aspartato a otra histidina, y posteriormente se transfiere el grupo fosforilo a un aspartato conservado en el regulador de respuesta SsrB (Hoch, 2000; Feng *et al.*, 2003). SsrB es un regulador de respuesta, miembro de la subfamilia NarL/FixJ, que contiene dos dominios. El dominio receptor N-terminal contiene el sitio de fosforilación conservado de ácido aspártico, y el dominio efector C-terminal es el de unión a DNA (Baikalov *et al.*, 1996). SsrB funciona por un mecanismo de activación en el cual el motivo hélice-giro-hélice (HTH) de reconocimiento de DNA en el dominio C-terminal está bloqueado físicamente por el extremo N-terminal y la fosforilación desencadena un cambio conformacional que libera este efecto inhibitorio, exponiendo el motivo HTH y promoviendo la dimerización. Para activar la transcripción, SsrB debe estar fosforilado en el Asp⁵⁶, aunque se ha reportado que su sobreexpresión puede activar a los genes de SPI-2 en ausencia de la cinasa SsrA (Feng *et al.*, 2004).

SsrB induce la expresión de los genes de SPI-2, así como de genes localizados fuera de esta isla, contrarrestando la represión que ejerce H-NS sobre

los promotores de estos genes (Walthers *et al.*, 2007). Se ha propuesto que SsrB interactúa primero con el DNA como monómero y posteriormente se dimeriza (Carrol *et al.*, 2009, Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010). Recientemente se definió una secuencia de reconocimiento de SsrB que consiste en una secuencia heptamérica, dos secuencias de 7 pb separadas por 4 pb (7-4-7), que forma un palíndromo degenerado de 18 pb (Fig. 8), en donde la conservación en secuencia y orientación de uno de los heptámeros es suficiente para el reconocimiento por SsrB. Esta secuencia sugiere que la dimerización de SsrB es probablemente requerida para que se lleve a cabo la activación transcripcional de sus genes blanco a través de una primera interacción fuerte de un monómero con el heptámero más conservado, la cual podrá estabilizar la interacción de un segundo monómero con la secuencia menos conservada (Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010).

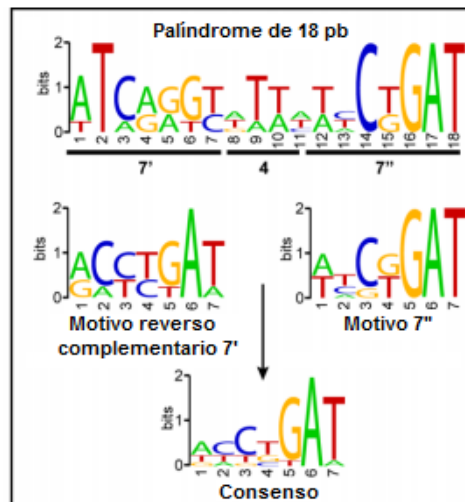


Figura 8. Secuencia consenso de unión reportada para SsrB. Esta secuencia es un heptámero que se generó a partir de un palíndromo de 18 pb que reconoce SsrB en promotores de SPI-2 (Adaptado de Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010).

1.5. Regulación de la expresión de los genes del flagelo

Se ha reportado que cuando *Salmonella* se encuentra dentro de macrófagos se reprime la expresión de los genes que codifican para la maquinaria flagelar. Esto puede deberse a que intracelularmente *Salmonella* ya no requiere de

motilidad, además de que la flagelina es el ligando para el TLR5 (Toll-like receptor 5), proteína que forma parte del sistema inmune innato. Por lo anterior, se sugiere que la represión en la síntesis del flagelo contribuye a disminuir la respuesta inmune innata del hospedero contra *Salmonella* (Eriksson et al., 2003).

La mayor parte de los genes flagelares se agrupan en regiones limitadas del cromosoma y se encuentran organizados en más de 15 operones (Aldridge and Hughes, 2002). En el caso de *S. Typhimurium*, su regulón está estructurado en una vía secuencial en la cual los operones flagelares están divididos dentro de tres clases con respecto a su jerarquía en la cascada de regulación (Chilcott and Hughes, 2000; Takaya et al., 2012). La clase 1 contiene sólo al operón *flhDC*, que codifica para el complejo heteromultimérico FlhD₄C₂. Este operón está localizado arriba de la cascada del regulón, por lo cual su función es absolutamente requerida para la expresión del resto de los genes. Esto lo hace un punto de regulación crucial, en el cual varios reguladores globales y señales ambientales influyen en la decisión de que se lleve a cabo o no la síntesis del flagelo (Chilcott and Hughes, 2000). La clase 2 contiene un amplio número de genes flagelares, los cuales están involucrados principalmente en la formación del cuerpo basal y del gancho. La transcripción de los promotores de esta clase es activada por el complejo FlhDC, el cual se une a la región promotora e interactúa con la región C-terminal de la subunidad α de la RNA polimerasa (Liu and Matsumura, 1995). En esta clase se incluye el gen *fliA*, que codifica para un factor sigma alternativo de la RNA polimerasa, σ^{28} , necesario para la transcripción de los genes de la clase 3 (Ohnishi et al., 1990). A su vez, a partir de los promotores de esta clase también se expresa un factor anti- σ^{28} , la proteína FlgM, que se une a FliA y previene su asociación al core de la RNA polimerasa (Kutsukake and Iino, 1994). A esta clase también pertenece el gen *fliZ*, que codifica para un activador de genes de la clase 2 y 3 (Kutsukake et al., 1999). Finalmente, la clase 3 contiene genes involucrados en el ensamble del filamento, la rotación flagelar y la quimiotaxis (Fig. 9). El gen *fliC* codifica para la proteína flagelina, la cual es requerida en grandes cantidades para el ensamble del filamento flagelar (Chilcott and Hughes, 2000; Karlinsey et al., 2000).

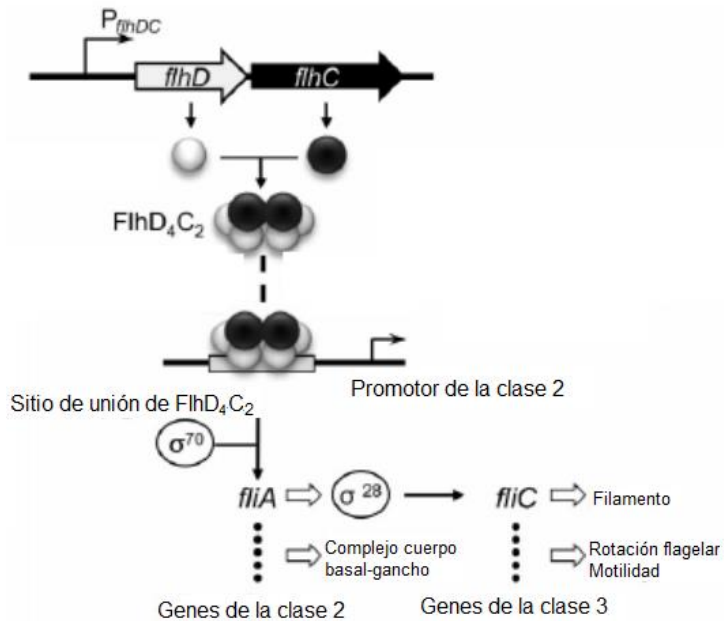


Figura 9. Regulación de la expresión de los genes del flagelo. La regulación de la expresión de los genes flagelares inicia con los productos del operón *flhDC*, el cual codifica para un complejo heteromultimérico $FlhD_4C_2$, que se une directamente a los promotores de la clases 2. Uno de los genes de esta clase es *fliA*, que codifica para un factor sigma alternativo, σ^{28} , necesario para la transcripción de los genes de la clase 3, entre los que se encuentra *fliC* (Adaptado de Takaya *et al.*, 2012).

Entre los reguladores positivos para la expresión de los genes flagelares se encuentra CsrA, la cual se une al RNAm de *flhDC*, estabilizándolo, y de esta forma activando postranscripcionalmente la expresión de este operón (Wei *et al.*, 2001; Lawhon *et al.*, 2003). También se ha reportado que H-NS regula positivamente la síntesis del flagelo a través de la activación del operón *flhDC* (Kutsukake, 1997). De igual forma, se ha propuesto que Fis es un regulador positivo para el flagelo, al requerirse para la expresión de los genes flagelares y la movilidad en *Salmonella* (Kelly *et al.*, 2004). El regulador de respuesta RcsB, que forma parte del sistema Rcs, regula negativamente la expresión de los genes flagelares, al unirse directamente a la región promotora de *flhDC* (Wang *et al.*, 2007). Por otra parte, se observó que el sistema de dos componentes PhoP/Q reprime la transcripción de *fliC* (Adams *et al.*, 2001).

2. ANTECEDENTES

Varios reguladores codificados fuera de las SPIs han sido involucrados en la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, los cuales controlan positiva o negativamente la expresión de HilD o HilA, en el caso de los genes de SPI-1, o del sistema SsrA/B, en el caso de los genes de SPI-2 (Fass and Groisman, 2009; Martínez *et al.*, 2011; Golubeva *et al.*, 2012).

En nuestro laboratorio se ha generado conocimiento muy importante acerca de los mecanismos moleculares que controlan la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 (Bustamante *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2014). Se encontró que tanto los genes de SPI-1 como los genes de SPI-2 se expresan cuando *Salmonella* crece en el medio rico en nutrientes LB, pero esta expresión se da en diferentes fases del crecimiento, en la fase estacionaria temprana y en la fase estacionaria tardía, respectivamente (Bustamante *et al.*, 2008). Por ejemplo, en la figura 10 se muestra que la expresión de HilA (SPI-1) se detecta a partir de la hora 4 del crecimiento de *S. Typhimurium* en LB y su expresión comienza a disminuir a partir de la hora 8, mientras que la expresión de SsrB (SPI-2) se induce a partir de la hora 8. En estas condiciones de crecimiento, HilD, regulador codificado en SPI-1, induce la expresión consecutiva de HilA y del sistema SsrA/B, estableciéndose así una comunicación a nivel de expresión genética entre SPI-1 y SPI-2 (Bustamante *et al.*, 2008). A la fecha no se ha esclarecido el mecanismo que determina esta expresión diferencial de los genes de SPI-1 y SPI-2, siendo que ambos son regulados por HilD. De manera interesante, cuando *Salmonella* crece en el medio mínimo MM-N la expresión de SsrA/B, y como consecuencia la del resto de genes de SPI-2, se induce por un mecanismo independiente de HilD, que involucra a los reguladores OmpR, SlyA y PhoP (Bustamante *et al.*, 2008).



Figura 10. Expresión de HIIA y SsrB en diferentes fases del crecimiento de *S. Typhimurium* en el medio de cultivo LB. La expresión de SsrB y HIIA-FLAG se detectó mediante Western-blot. Como control se detectó la expresión de la proteína DnaK, la cual se expresa constitutivamente en estas condiciones. Ver el texto para la descripción (Bustamante *et al.*, 2008).

Con resultados generados en nuestro laboratorio y en otros grupos, se ha integrado una cascada de regulación que controla la expresión de los genes SPI-1 y SPI-2, la cual está formada por múltiples reguladores (Fig. 11).

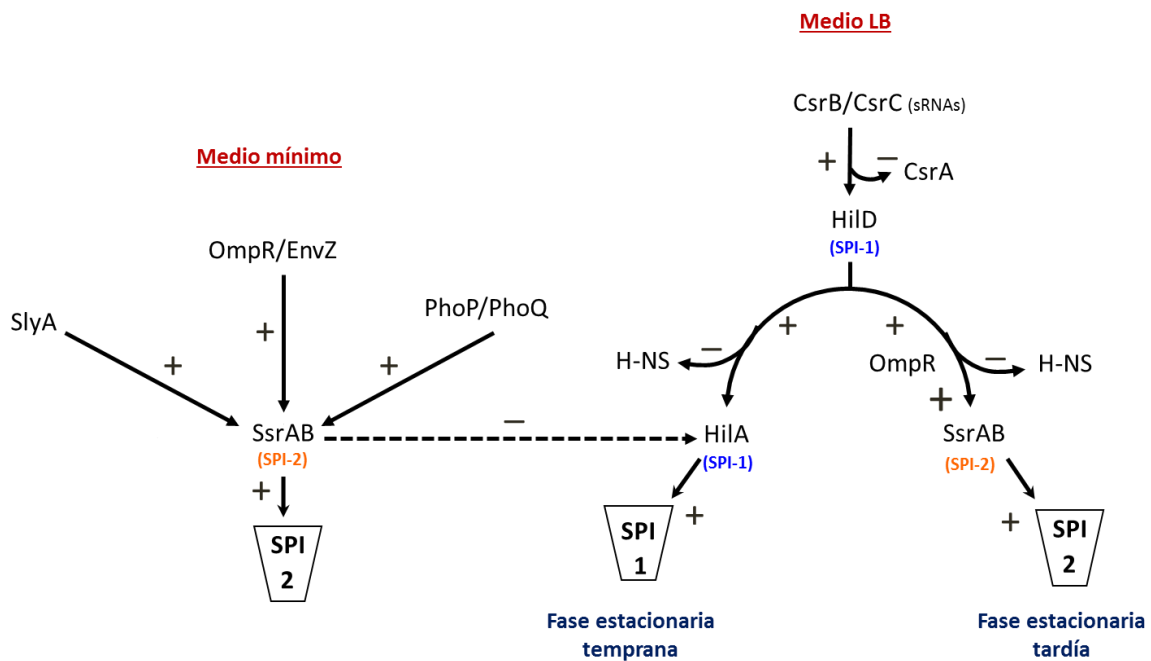


Figura 11. Cascada de regulación de los genes de SPI-1 y SPI-2. Cuando *Salmonella* crece en LB, los RNAs pequeños CsrB y CsrC contrarrestan la represión postranscripcional que ejerce la proteína CsrA sobre la expresión de HilD. Al expresarse, HilD induce la expresión consecutiva de HIIA y del sistema de dos componentes SsrA/B, reguladores positivos centrales de los genes de SPI-1 y SPI-2, respectivamente, contrarrestando la represión que ejerce sobre sus respectivos genes el regulador global H-NS. Por otro lado, cuando *Salmonella* crece en un medio mínimo, la expresión de SsrA/B, y como consecuencia la del resto de genes de SPI-2, se induce por un mecanismo independiente de HilD, que involucra a los sistemas de dos componentes OmpR/EnvZ

y PhoP/PhoQ, así como al regulador SlyA (Bustamante *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2011). La flecha punteada indica el efecto de represión que tiene SsrB sobre la expresión de *HilA*.

Varias preguntas interesantes han surgido de nuestros estudios. Por ejemplo, ¿cómo se reprime la expresión dependiente de HilD de los genes de SPI-1 en fase estacionaria tardía del crecimiento en LB y en el crecimiento en medios mínimos? ¿La represión de los genes de SPI-1 en estas condiciones está ligada a la expresión de los genes de SPI-2? (Fig. 10 y 11). A este respecto, recientemente se encontró que la expresión constitutiva de SsrB, a partir de un plásmido, reprime la expresión de *hilA* y la secreción de proteínas de SPI-1 (Fig. 12A y B), sugiriendo que el sistema de dos componentes SsrA/B, que regula positivamente a los genes de SPI-2, podría controlar negativamente la expresión de los genes de SPI-1. En apoyo a esto, en la cepa WT de *S. Typhimurium* la inducción de la expresión de SsrB coincide con el inicio de la disminución de la expresión de *HilA* (Fig. 10). Así, estos resultados podrían indicar una comunicación recíproca a nivel transcripcional entre SPI-1 y SPI-2, en la que primero HilD induciría la expresión consecutiva de los genes de SPI-1 y SPI-2, cuando *Salmonella* crece en LB y probablemente cuando se encuentra en el lumen intestinal, y posteriormente SsrB induciría la expresión de los genes de SPI-2 y reprimiría a los genes de SPI-1, cuando *Salmonella* crece en la fase estacionaria tardía en LB, o en medio mínimo, y probablemente cuando se encuentra dentro de las células de su hospedador.

Adicionalmente, se observó que la expresión constitutiva de SsrB, a partir de un plásmido, reprime la secreción de *FliC*, componente de la flagelina (Fig. 12A), lo que sugiere que el sistema de dos componentes SsrA/B también podría controlar negativamente la expresión de los genes del flagelo.

En este proyecto investigamos más a detalle el fenómeno de represión de los genes de SPI-1 mediado por SsrB, así como su posible papel como represor en la expresión de los genes del flagelo.

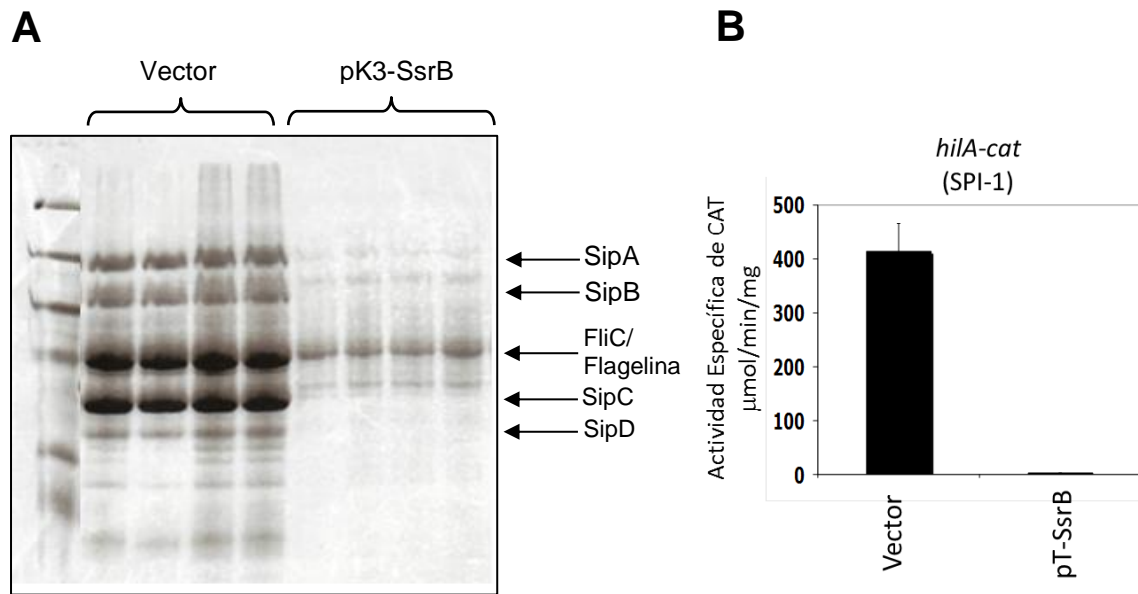


Figura 12. La expresión constitutiva de SsrB reprime a los genes de SPI-1 y del flagelo. (A) Perfil de proteínas secretadas de la cepa *S. Typhimurium* SL1344 WT conteniendo el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-SsrB, que expresa constitutivamente a SsrB (SsrB en concentraciones elevadas puede actuar sobre sus genes blanco, independientemente de su estado de fosforilación). Las proteínas SipA, SipB, SipC y SipD se codifican en SPI-1 y se secretan por el SST3 codificado en esta isla. La proteína FliC es una de las subunidades del flagelo. (B) Expresión de la fusión transcripcional *hilA-cat* (SPI-1), contenida en el plásmido *philA-cat*, en la cepa WT de *S. Typhimurium* conteniendo el vector pMPM-T3 o el plásmido pT3-SsrB, que expresa de manera constitutiva a SsrB. Las cepas bacterianas se crecieron en LB a 37°C, durante 4 horas para determinar la expresión de las fusiones transcripcionales y durante 9 horas para obtener los perfiles de proteínas secretadas (Bustamanete *et al.*, no publicado).

3. HIPÓTESIS

El sistema SsrA/B reprime a los genes de SPI-1 y a los genes flagelares actuando sobre *hilD* y *flhDC*, que codifican para los reguladores centrales de estos genes, respectivamente.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar el mecanismo molecular por el cual SsrB reprime la expresión de los genes de SPI-1 y del flagelo

4.2. Objetivos Particulares

1. Identificar los genes de la cascada de regulación de SPI-1 controlados directamente por SsrB.
2. Definir si SsrB regula la expresión de los genes del flagelo.
3. Determinar la secuencia que reconoce SsrB en sus genes blanco.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas, plásmidos y oligonucleótidos empleados en este trabajo se enlistan en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

Cepa	Descripción	Origen o referencia
<u>S. Typhimurium:</u>		
WT	Cepa silvestre SL1344, Str ^R	Hoiseth and Stocker, 1981
Δ ssrB::km	Derivada de SL1344; Δ ssrB::km, Str ^R , Km ^R	Bustamante, <i>et al.</i> , 2008
Δ slyA/ Δ ssrAB::km	Derivada de Δ slyA; Δ slyA/ Δ ssrAB::km Str ^R , Km ^R	Este trabajo
Δ hilD/ Δ hns	Derivada de Δ hilD/ Δ hns::km; Δ hilD/ Δ hns, Str ^R	Bustamante, <i>et al.</i> , no publicado
Δ lon	Derivada de Δ lon::km; Δ lon, Str ^R	Bustamante, <i>et al.</i> , no publicado
Δ hilE	Derivada de Δ hilE::km; Δ hilE, Str ^R	Bustamante, <i>et al.</i> , no publicado
invF-FLAG	Derivada de SL1344; expresa la proteína InvF-FLAG	Bustamante, <i>et al.</i> , no publicado
Δ ssrB::km/invF-FLAG	Derivada de SL1344; expresa la proteína InvF-FLAG	Bustamante, <i>et al.</i> , no publicado
Δ csrA::km	Derivada de SL1344; Δ csrA::km, Str ^R , Km ^R	Martínez <i>et al.</i> , 2011
Δ flhDC::km	Derivada de SL1344; Δ flhDC::km, Str ^R , Km ^R	Este trabajo
<u>E. coli:</u>		
DH10 β	Cepa de laboratorio, Str ^R	Invitrogen
DH5 α	Cepa de laboratorio, NaI ^R	Invitrogen

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción *	Origen o referencia
pKK232-8	Derivado de pBR322, contiene el gen <i>cat</i> (cloranfenicol acetil transferasa) sin promotor, empleado para la construcción de fusiones transcripcionales; Amp ^R	Pharmacia LKB Biotechnology (Brosius, 1984)
pssaG-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssaG-cat</i> , que lleva la región -303 a +361, Amp ^R	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
pinvF-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>invF-cat</i> , que lleva la región -306 a +231, Amp ^R	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
philA-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilA-cat</i> , que lleva la región -410 a +466, Amp ^R	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
philD-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilD-cat</i> , que lleva la región -364 a +88, Amp ^R	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
philD-cat-108	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilD-cat</i> , que lleva la región -108 a +88, Amp ^R	Bustamante <i>et al.</i> , no publicado
philD-cat-48	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilD48-cat</i> , que lleva la región -48 a +88, Amp ^R	Bustamante <i>et al.</i> , no publicado
philDp-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilDp-cat</i> , que lleva la región -37 a +6, Amp ^R	Este trabajo
philDpMut-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilDpMut-cat</i> , que lleva la región -37 a +6 con cuatro bases mutadas (Fig. 16), Amp ^R	Este trabajo

philDpMutG-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilDpMutG-cat</i> , que lleva la región -37 a +6 con dos bases mutadas (Fig. 17), Amp ^R	Este trabajo
pcsrB-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrB-cat</i> , que lleva la región -372 a +18, Amp ^R	Martínez <i>et al.</i> , 2011
pcsrB114-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrB114-cat</i> , que lleva la región -114 a +18, Amp ^R	Martínez <i>et al.</i> , 2014
pcsrB50-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrB50-cat</i> , que lleva la región -50 a +18, Amp ^R	Martínez <i>et al.</i> , 2014
pcsrC-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrC-cat</i> , que lleva la región -351 a +63, Amp ^R	Martínez <i>et al.</i> , 2011
pcsrC119-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrC119-cat</i> , que lleva la región -119 a +63, Amp ^R	Martínez <i>et al.</i> , 2014
pcsrC59-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrC59-cat</i> , que lleva la región -59 a +63, Amp ^R	Martínez <i>et al.</i> , 2014
pcsrA-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrA-cat</i> , que lleva la región -327 a +61, Amp ^R	Martínez <i>et al.</i> , 2011
philE-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilE-cat</i> , que lleva la región -910 a +70, Amp ^R	De la Cruz <i>et al.</i> , no publicado
plon-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>lon-cat</i> , Amp ^R	Bustamante, <i>et al.</i> , no publicado
pfliC-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>fliC-cat</i> , Amp ^R	Bustamante, <i>et al.</i> , no publicado
pfliA-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>fliA-cat</i> , que lleva la región -312	Este trabajo

	a +127, Amp ^R	
pflhD-cat	Derivado de PKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>flhD-cat</i> , que lleva la región -836 a +91, Amp ^R	Este trabajo
pMPM-K3	Vector de clonación de bajo número de copias; origen P15A, Km ^R	Mayer, 1995
pK3-SsrB	Derivado de pMPM-K3, contiene el gen estructural <i>ssrB</i> y el sitio de unión al ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> , Km ^R	Bustamante, <i>et al.</i> , no publicado
pKD4	Derivado de pANTS _γ ; contiene el gen de resistencia a Km, flanqueado por FRT's	Datsenko y Wanner; 2000
pKD46	Derivado de pINT-ts, contiene el sistema de recombinación del fago λRojo bajo el control de un promotor inducible por arabinosa y; AmpR	Datsenko y Wanner; 2000

* Las posiciones de las regiones contenidas en las fusiones transcripcionales son con respecto al inicio de la transcripción de cada gen.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Nombre	Secuencia (5'-3')	Modificación
Construcción de la fusión <i>flhD-cat</i>		
flhD-RV11	TCCAAGCTTATCAAACGCTGTGCAAGGAG	<i>Hind</i> III
flhD-FW22	TGAGGATCCGGGGTGACGGCAACGG	<i>Bam</i> HI
Construcción de la fusión <i>fliA-cat</i>		
fliA-RV33	GCAAAGCTTCGTGACGCACCAGCG	<i>Hind</i> III
fliA-FW44	GGAGGATCCAAAGCACCAGCTTGAAGAGG	<i>Bam</i> HI
Construcción de la fusión <i>hilDp-cat</i>		
hilDPR <i>Hind</i> III	AGCTTCCTTACTGGTATCCTACTGAAAAA TCTGAGTTGTAAATGCG	<i>Hind</i> III
hilDPF <i>Bam</i> HI	GATCCGCATTTACAACCTCAGATTTTTTCAG TAGGATACCAGTAAGGA	<i>Bam</i> HI

Construcción de la fusión *hilDpMut-cat*

hilDPmutRHindII	AGCTTCCTTACTGGTATCCTACTGAAAAAG CTTAAGTTGTAAATGCG	<i>HindIII</i>
hilDPmutFBamHI	GATCCGCATTTACAACCTTAAGCTTTTTTCAG TAGGATACCAGTAAGGA	<i>BamHI</i>

Construcción de la fusión *hilDpMutG-cat*

hilDPmutGRHindI	AGCTTCCTTACTGGTATTCTACTGAAAAA TTTGAGTTGTAAATGCG	<i>HindIII</i>
hilDPmutGFBamHI	GATCCGCATTTACAACCTCAAATTTTTTCAG TAGAATACCAGTAAGGA	<i>BamHI</i>

Construcción de la mutante Δ *flhDC::km*

SflhDCH1P1	ATGGGAACAATGCATACATCCGAGTTGCTAAAACACATTTATTGTAGG CTGGAGCTGCTTCG
SflhDCH2P2	TTAAACAGCCTGTTCGATCTGTTCATCCAGCAGTTGTGGAATCATATG AATATCCTCCTTAG

Caracterización de la mutante Δ *flhDC::km*

flhDC-FKpnI	GTCGGTACCTCCATAATGTCTGAGCGCTGC	<i>KpnI</i>
flhDC-RSacl	TGCGAGCTCGGGCGATTAACGCGAAGG	<i>SacI</i>
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	
K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	

Ensayos de retardamiento:

		Gen blanco
SirAF-BamHI	GCCGGATCCATCGCCTGCAGCATCAGC	<i>sirA</i>
SirAR-HindIII	AGCAAGCTTCACCGACAACCTTTAATGC	<i>sirA</i>
pKK-ssaH-F	CGCGGATCCTGGTAGTTTGGGACTACA	<i>ssaG</i>
pKK-ssaH-R	CCCAAGCTTATAACCGTTAGCGCTGGT	<i>ssaG</i>
hilDFBamHI	AATGGATCCTCACAGCCGTTTCAGTGAG	<i>hilD</i>
hilDRHindIII	CTGAAGGTTATCTGCGGCAGGACGC	<i>hilD</i>
HilD-48Fw	CAAGGATCCCTAATAAAGAGCATTTACAACCTCAG	<i>hilD</i>

PKKSEQ1-VB	CAACGGTGGTATATCCAGTG	Vector pKK232-8
PKKSEQ2-VB	GAGGCCCTTTCGTCTTCAAG	Vector pKK232-8
hilA1FBamHI	ATCGGATCCCTCTGAGAACTATTTGC	<i>hilA</i>
hilA2RHindIII	GACAAGCTTTTCTGAGCGTAGCAGGG	<i>hilA</i>
csrB-Fw1HindIII	TTCAAGCTTCGACTCCCTGTGACGAAG	<i>csrB</i>
csrB-Rev1	TAGGCCACCTGGTCACGC	<i>csrB</i>
csrB-114Rv	CTTGGATCCGTCTATATAAAACAATAATTTAAATG	<i>csrB</i>
csrB-50Rv	CTTGGATCCTTGTCTGTAAGCGTCTTGTAAAG	<i>csrB</i>
crc-BFwI	CTTCGGATCCGCAATCGGAAGGTAAATGG	<i>csrC</i>
crc-HRvI	CTTGAAGCTTCGCCTCCTGGCGCTCC	<i>csrC</i>
csrC-119Fw	TCGGGATCCGGCTCAAAGCCAGTTAATATAG	<i>csrC</i>
csrC-59Fw	GTCGGATCCAAAGGGATTTGCCGTGTCCGG	<i>csrC</i>
FliC-FWI-Hd	GACAAGCTTACAGACGCTCGATAGCGGTG	<i>fliC</i>
FliC-RVI-BH	GTTGGATCCCACACCTAATGATG	<i>fliC</i>
fliA-RV33	GCAAAGCTTCGTGACGCACCAGCG	<i>fliA</i>
fliA-FW44	GGAGGATCCAAAGCACCAGCTTGAAGAGG	<i>fliA</i>
fliH-RV11	TCCAAGCTTATCAAACGCTGTGCAAGGAG	<i>fliH</i>
fliH-FW22	TGAGGATCCGGGGTGACGGCAACGG	<i>fliH</i>

Tabla 4. Antibióticos y dosis empleadas en este trabajo

Estreptomina (Str)	100 µg/ml
Ampicilina (Amp)	200 µg/ml
Kanamicina (Km)	20 µg/ml
Ácido Nalidíxico	15 µg/ml

5.1. Preparación de células electrocompetentes

Las diferentes cepas de interés se cultivaron en 5 ml de LB adicionado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al otro día, se emplearon 1 ml de estos cultivos para inocular un matraz de 250 ml con 100 ml de LB adicionado con los mismos antibióticos. Estos cultivos se incubaron durante 2 a 3 h a 37°C a 200 rpm, hasta que alcanzaron una D.O._{600nm} de 0.6 a 0.8. Posteriormente los cultivos se centrifugaron por 8 min a 8 000 rpm a 4°C en tubos Nalgene, se desechó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 30 ml de agua MQ fría estéril y se centrifugó en las mismas condiciones. Después, el sobrenadante se desechó, se resuspendió la pastilla en 30 ml de glicerol al 10% estéril frío y se procedió a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 500 µl de glicerol al 10% estéril frío.

5.2. Electroporación

Se mezclaron 40 µl de células electrocompetentes con 5 µl de DNA plasmídico. Esta mezcla se colocó en una celda de electroporación fría (BIORAD) y se le dio un pulso eléctrico de 2.5 kV durante 5.5 ms usando un electroporador “*E.coli* pulser” (BIORAD). Posteriormente se agregó a la celda 1 ml de medio de cultivo SOC y se mezcló, después se transfirió a un tubo de ensayo y se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación a 200 rpm. Finalmente, se sembraron 250 µL del cultivo en cajas Petri con medio LB solidificado con agar al 1.5% con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C durante 16 horas aproximadamente.

5.3. Cultivos bacterianos para cuantificar la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2

✓ *Medio LB*

Las cepas transformadas se cultivaron en 5 ml de medio LB adicionado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, se tomaron 500 µl de cada cultivo y se inocularon 2 matraces de 250 ml con 50 ml de LB adicionado con los mismos antibióticos. Estos cultivos se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante 9 horas. Se tomaron muestras de 1 ml de cultivo a las 4 h y 9 h para analizar la expresión de las diferentes fusiones transcripcionales.

Posteriormente se procedió a centrifugar todas las muestras durante 2 min a 13 000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas obtenidas se lavaron con 650 µl de solución de lavado TDTT (Tris-HCl, pH 7.8 50 mM, y DL-ditiotreitol 30 µM). Después de centrifugar en las mismas condiciones se desechó el sobrenadante. En caso de no utilizar las pastillas inmediatamente, se almacenaron a -20°C, de lo contrario, se resuspendieron en 600 µl de TDTT.

✓ *Medio MM-N*

De igual forma que para la cuantificación de la expresión de los genes en medio LB, las cepas que contienen los plásmidos que llevan las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, se cultivaron en 5 ml de medio LB adicionado con los antibióticos para los que tienen resistencia (Tabla 4) y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente se hicieron dos pastillas centrifugando 1.5 ml de los cultivos y se les dio un lavado con 1 ml de medio MM-N. Posteriormente las pastillas se resuspendieron en 500 µl de MM-N y con cada una de ellas se inocularon dos matraces con 50 ml de MM-N. Los cultivos se incubaron durante 16 h a 37°C en agitación a 200 rpm, hora a la cual se tomó una muestra de 1.5 ml, también midiéndose la densidad óptica de los cultivos a 600 nm. Las muestras se centrifugaron durante 2 min y se desechó

el sobrenadante. Las pastillas obtenidas se lavaron con 850 μ l de solución de lavado TDTT. En caso de no utilizar las pastillas inmediatamente, se almacenaron a -20°C, de lo contrario, se resuspendieron en 750 μ l de TDTT.

✓ *Medio PCN*

Para la cuantificación de la expresión de los genes en medio PCN, las cepas que contienen los plásmidos que llevan las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, se cultivaron en 5 ml de medio Lennox adicionado con los antibióticos para los que tienen resistencia (Tabla 4) y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente se hicieron dos pastillas centrifugando 25 μ l de los cultivos y se les dio dos lavados con 25 μ l de medio PCN. Posteriormente las pastillas se resuspendieron en 25 μ l de PCN y con cada una de ellas se inocularon dos matraces con 25 ml de PCN. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm, hasta que alcanzaron una D.O._{600nm} de 0.3, en un tiempo aproximado de 9 h, momento en el cual se concentró el contenido del matraz centrifugando durante 8 min a 8 000 rpm y desechando el sobrenadante. Las pastillas obtenidas se lavaron con 500 μ l de solución de lavado TDTT. En caso de no utilizar las pastillas inmediatamente, se almacenaron a -20°C, de lo contrario, se resuspendieron en 500 μ l de TDTT.

5.4. Cuantificación de la actividad enzimática específica de CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa)

La actividad de la enzima Cloranfenicol Acetil Transferasa fue medida usando una modificación de un método espectrofotométrico. Primero, las pastillas resuspendidas en TDTT fueron sonicadas durante 3 min en un sonicador “Vibra Cell”, con pulsos de 9.9 s y períodos de reposo de 9.9 entre cada pulso, obteniéndose un tiempo total de sonicación de 6 min. Posteriormente las muestras sonicadas fueron centrifugadas durante 15 min a 14 000 rpm y se transfirió el sobrenadante obtenido a tubos nuevos.

Para la cuantificación de las proteínas totales en los sobrenadantes obtenidos se utilizaron placas de cultivo celular de 96 pozos (Costar), donde se agregaron por duplicado 10 μ l de cada muestra por pozo, utilizando como blanco en el pozo correspondiente 10 μ l de TDTT. Después, se añadió a cada pozo 200 μ l de una mezcla (50:1) de los reactivos del estuche BCA "Protein Assay Reagent" (Pierce) y se incubó la placa durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se calculó la concentración de proteínas totales mediante la lectura de la absorbancia a 562 nm en un lector automatizado de microplacas tipo CERES 900 C (Bio-Tek Instruments Inc.), utilizando el programa KC3. Los valores obtenidos se interpolaron en una curva estándar de concentraciones de la proteína BSA (albúmina de suero de bovino) previamente almacenada en dicho programa.

Para calcular la actividad enzimática de CAT, 5 μ L de cada muestra fueron agregadas por duplicado en otra placa de cultivo celular de 96 pozos, seguido de 200 μ l de una mezcla de reacción de Tris-HCl pH 7.8 0.1 M, DTNB (ácido 5, 5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico) *Research Organics*) 1 mM, acetil-CoA 0.1 mM (Pharmacia Biotech) y cloranfenicol 0.1 mM (Sigma). La actividad de CAT se determinó, inmediatamente después de agregarse la mezcla de reacción, utilizando el mismo lector de microplacas posicionado en el modo de cinética, tomándose lecturas de absorbancia a 405 nm cada 5 s durante 5 min de reacción. Los valores de actividad obtenidos de cada muestra se interpolaron en una curva estándar de actividad de CAT (de 0 a 2 500 U/ml), previamente almacenada en el programa KC3. Finalmente, la actividad específica de CAT (μ mol/min/mg) se obtuvo al dividir las unidades de actividad de CAT entre la concentración de proteínas totales de cada muestra.

5.5. Construcción de los plásmidos que contienen las fusiones transcripcionales *flhD-cat*, *fliA-cat*, *hilDp-cat*, *hilDpMut-cat* y *hilDpMutG-cat*

Utilizando oligonucleótidos específicos que contienen los sitios de restricción necesarios (Tabla 3), se amplificaron las regiones reguladoras de los genes *flhD* y *fliA* mediante PCR. En las figuras 13 y 14 se esquematiza la región que fue amplificada y empleada para la construcción de cada fusión. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE (Tris-Acetato-EDTA 0.5X, pH 8.0) a 80 V. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 µl/mg) y el DNA visualizado en un transiluminador de luz UV de onda corta (Sigma), permitió identificar la banda del tamaño correspondiente a la región amplificada para cortarla y purificarla mediante el kit “AxyPrep DNA gel extraction kit” (Axygen). Posteriormente el fragmento y el plásmido pKK232-8 (Tabla 2) fueron digeridos con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*. Las digestiones dobles fueron purificadas mediante el kit “AxyPrep PCR cleanup kit” (Axygen) y se visualizaron en un gel de agarosa al 1%. De acuerdo a las cantidades observadas en éste, el producto de PCR y el vector pKK232-8 se ligaron poniéndolos en la reacción de ligación en una proporción aproximada de 5:1 molar.

Para las fusiones *hilDp-cat*, *hilDpMut-cat* y *hilDpMutG-cat*, se utilizaron dos oligonucleótidos complementarios que abarcan la región promotora del gen *hilD*, de la posición -37 a la +6, los cuales al hibridar entre ellos generan un fragmento de DNA de doble cadena con los extremos cohesivos para *HindIII* y *BamHI* (Tabla 3). Los dos oligonucleótidos para la fusión *hilDpMut-cat* contienen cuatro cambios nucleotídicos: -21T>C, -22A>G, -23G>A y -25C>T, mientras que los dos oligonucleótidos para la fusión *hilDpMutG-cat* contienen dos cambios nucleotídicos: -9G>A y -23G>A. En las figuras 15, 16 y 17 se esquematiza la secuencia que fue utilizada para la construcción de estas fusiones. Se mezclaron concentraciones iguales de ambos oligonucleótidos, y la mezcla se calentó a 94°C durante 10 minutos, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente durante una hora para que se llevara a cabo la hibridación. El producto generado

de la hibridación de estos oligos se puso a ligar en el vector pKK232-8 (Tabla 2) digerido con las enzimas de restricción *Hind*III y *Bam*HI.

En las reacciones de ligación, primero se mezcló el fragmento de DNA que se quería clonar y el fragmento de DNA del vector linearizado. Esta reacción se incubó a 16°C toda la noche; al día siguiente la ligación se precipitó usando glicógeno, para lo cual se les agregó 1 µl de glicógeno (20 mg/ml) (Roche) y posteriormente 500 µl de etanol absoluto, dejando incubar durante 30 min a -20 °C. Posteriormente se centrifugaron 15 min a 14 000 rpm, decantando el sobrenadante obtenido. Se agregaron 1 ml de etanol al 70% y se volvió a centrifugar en las condiciones anteriores, desechando perfectamente el sobrenadante. Los tubos se secaron en Speedvac sc100 (Savant) y se resuspendieron en 10 µl de agua MQ, de los cuales 5 µl se utilizaron para transformar la cepa *E. coli* DH10β.

Para confirmar que la clonación de los fragmentos de *flhD*, *fliA*, *hilDp*, *hilDpMut* y *hilDpMutG* en el plásmido pKK232-8 se llevó a cabo, se purificaron plásmidos de varias transformantes de *E. coli* DH10β mediante miniprep, mismos que fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%. Aquéllos plásmidos que contenían un inserto, fueron utilizados para amplificar por PCR el inserto que contenían y así corroborar su tamaño. Se seleccionaron los plásmidos que tuvieran el inserto correcto y se purificaron con el estuche “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche). Finalmente se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM para obtener y verificar la secuencia de nucléotidos.

De esta forma se obtuvieron los plásmidos pflhD-cat, pfliA-cat, philDp-cat, philDpMut-cat y philDpMutG que contienen fusiones transcripcionales de los genes *flhD*, *fliA* y *hilD*, respectivamente, al gen reportero *cat* (Tabla 2).

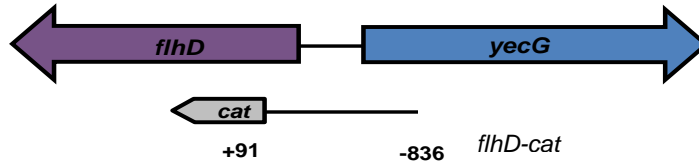


Figura 13. Esquema de la fusión transcripcional *flhD-cat*. Se muestran las posiciones que abarca la región contenida en esta fusión, con respecto al inicio de la transcripción de *flhD*.

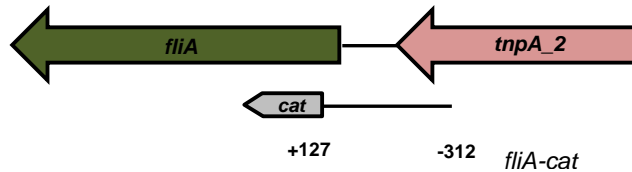


Figura 14. Esquema de la fusión transcripcional *fliA-cat*. Se muestran las posiciones que abarca la región contenida en esta fusión, con respecto al inicio de la transcripción de *fliA*.

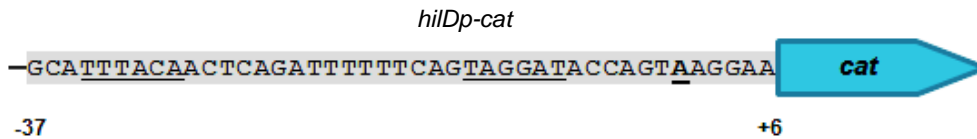


Figura 15. Esquema de la fusión transcripcional *hilDp-cat*. Se muestra la secuencia de la región promotora que abarca la región contenida en esta fusión, con respecto al inicio de la transcripción de *hilD*.

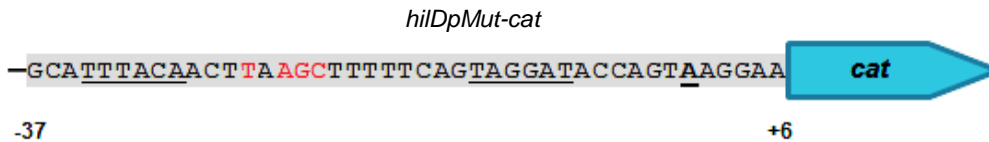


Figura 16. Esquema de la fusión transcripcional *hilDpMut-cat*. Se muestra la secuencia de la región promotora que abarca la región contenida en esta fusión, con respecto al inicio de la transcripción de *hilD*. Las cuatro bases cambiadas se indican en color rojo.

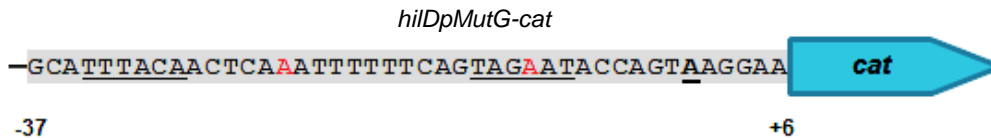


Figura 17. Esquema de la fusión *hilDp-MutG-cat*. Se muestra la secuencia de la región promotora que abarca la región contenida en esta fusión, con respecto al inicio de la transcripción de *hilD*. Las dos bases cambiadas se indican en color rojo.

5.6. Purificación de plásmidos

Las cepas que contienen los plásmidos de interés se cultivaron en 5 ml de LB adicionado con los antibióticos adecuados (Tabla 4) incubándose durante toda la noche a 37 °C con agitación a 200 rpm.

Los 5 ml de los cultivos se concentraron, centrifugando consecutivamente 2 min a 14 000 rpm y desechando el sobrenadante. Las pastillas de bacterias se resuspendieron en 150 µl de buffer SET. Posteriormente se agregaron 8 µl de RNAsa (10 mg/ml) y esta suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Transcurrido ese tiempo las bacterias se lisaron al agregarse 400 µl de solución de lisis (NaOH 0.2 M, SDS 1%) e incubando en hielo. Después de 5 min se agregaron 300 µl de acetato de amonio 7.5 M pH 7.8 y se incubó en hielo durante 10 min más, para posteriormente centrifugar durante 10 min a 14 000 rpm. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se le agregó 500 µl de isopropanol. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y después se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue desechado y se agregó 1 ml de etanol al 70%. Posteriormente se centrifugó durante 10 min a 14 000 rpm, el sobrenadante fue desechado y la pastilla de DNA se secó completamente, para finalmente resuspenderla en 60-100 µl de agua.

5.7. Perfil de proteínas secretadas

Las cepas a estudiar se cultivaron en 5 ml de medio LB adicionado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, se inocularon 5 ml de LB con 50 µl del inóculo de toda la noche y se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm. A las 8 horas de crecimiento se transfirieron 1.5 ml de cada tubo a 3 tubos eppendorf. Estas muestras se centrifugaron 5 min a 14 000 rpm. Posteriormente se transfirieron 1.3 ml del sobrenadante a tubos nuevos, se les agregaron 200 µl de ácido tricloroacético al 100% (Mallinckrodt) y se dejaron precipitando así durante toda la noche a -20°C.

Al día siguiente las proteínas precipitadas se concentraron por centrifugación durante 30 min a 14 000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas se disolvieron en 20 µl de buffer de carga SDS-PAGE 1X y se calentaron a 95°C durante 5 min. Después a cada tubo se le añadió 2 µl de Tris-HCl 2M pH 11 y se calentaron nuevamente a 95°C durante 5 min. Finalmente las 3 muestras de cada cepa se juntaron en un solo tubo y fueron visualizadas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. Los geles fueron teñidos con colorante azul brillante de Coomassie (Brilliant blue R-250).

5.8. Ensayos de retardamiento en gel (EMSA's, Electrophoretic Mobility Shift Assays) con DNA.

Las regiones reguladoras de los genes *sirA*, *ssaG*, *hilD*, *hilA*, *csrB*, *csrC*, *csrA*, *fliC*, *fliA* y *flhD* fueron amplificadas mediante PCR usando DNA cromosomal de *S. Typhimurium* SL1344 (Tabla1) y los respectivos oligonucleótidos específicos (Martínez *et al.*, 2011) (Tabla 3). Los productos de PCR fueron purificados usando el estuche comercial "QIAquick PCR purification" (Qiagen). Aproximadamente 100 ng de cada uno de los diferentes fragmentos de DNA y 100 ng del fragmento *sirA* (control negativo) se incubaron con concentraciones crecientes de la proteína purificada SsrB, en un volumen total de 20 µl. Las reacciones de retardamiento fueron realizadas en el buffer de unión que contiene Tris pH 7.5 10 mM, KCl 50 mM, Glicerol 2.5%, MgCl₂ 5 mM y nP40 0.05%. Las interacciones se realizaron a temperatura ambiente durante 20 min y posteriormente los complejos proteína-DNA se separaron en un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones no desnaturizantes en amortiguador de corrida Tris-boratos-EDTA 0.5X. Para la visualización de los complejos DNA-proteína, los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml y se visualizaron en un transiluminador con luz UV de onda corta (Alpha-Imager UV transiluminator Innotech Corp.).

5.9. Inmunodetección de proteínas mediante “Western blot”

Muestras de aproximadamente 0.5 ml de cultivos, crecidos de acuerdo a lo descrito previamente en el apartado de “Cultivos bacterianos para cuantificar la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2”, se centrifugaron durante 2 min a 13 000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas de bacterias obtenidas fueron resuspendidas en 500 µl de amortiguador de carga SDS-PAGE 1X. Estas muestras se calentaron a 95 °C durante 5 min y se visualizó el extracto de proteínas totales en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%, usando amortiguador de corrida Tris-Glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0.1%).

Otro gel de los mismos extractos de proteínas se utilizó para la transferencia de éstas a una membrana de nitrocelulosa de poro de 0.45 µm (Millipore), en una cámara de transferencia semi-seca (Bio-Rad), usando amortiguador de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20%, SDS 0.04%) 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 0.03%) durante toda la noche.

Posteriormente la membrana se incubó en agitación durante 4 horas con los anticuerpos monoclonales anti-FLAG M2 (SIGMA) o anti-DNAK (StressGen), diluidos en PBST 1:20000. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó 3 veces con PBST en agitación durante 15, 5 y 5 minutos, respectivamente. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón (1:10000) (PIERCE) para detectar a DnaK y al anticuerpo anti-FLAG. Las membranas se mantuvieron en agitación durante una hora. Se realizaron de nuevo 3 lavados durante 15, 5 y 5 minutos, con PBST en agitación.

A continuación 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).

5.10. Construcción de la cepa mutante *flhDC::km*

La mutagénesis se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Datsenko y Warner (Datsenko and Warner, 2000). La estrategia general se basó en reemplazar los genes *flhD* y *flhC* en la cepa *S. Typhimurium* SL1344 (Tabla 1), con un gen seleccionable de resistencia a kanamicina que es generado por PCR utilizando oligonucleótidos que tienen 42 nucleótidos homólogos al gen que se desea remover (H1 *flhD* y H2 *flhC*) más la secuencia correspondiente a P1 y P2 del plásmido pKD4 (20 nucleótidos) (Tabla 3). En este procedimiento, la recombinación requiere la recombinasa del fago λ Rojo, la cual es sintetizada bajo el control de un promotor inducible por arabinosa en un plásmido de bajo número de copia (pKD46) (Tabla 2).

Inicialmente, se amplificó mediante PCR el gen de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4, empleando los oligonucleótidos SflhDCH1P1 y SflhDCH2P2 (Tabla 3). Se hicieron 5 PCR's y los productos se concentraron en uno solo. Para esto, se agregaron 100 μ l de acetato de amonio pH 7.8, 300 μ l de fenol y 300 μ l de cloroformo alcohol isoamílico, se mezcló y se centrifugó durante 5 min a 14000 rpm. Después se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó 1 ml de alcohol absoluto, se agitó y se dejó precipitar durante 1 hora a -70°C. Transcurrida la hora se centrifugó durante 30 min a 14000 rpm, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70%. Después se centrifugó durante 10 min a 14000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en 7 μ l de agua. Se utilizó 1 μ l de este producto para en una electroforesis en gel de agarosa al 1% con la finalidad de revisar el producto concentrado.

Por otra parte, se puso un pre inóculo de la cepa *S. Typhimurium*/pKD46 en una caja de LB adicionada con ampicilina y se incubó durante toda la noche a 30°C. Al otro día se inocularon 40 colonias en 25 ml de SOB suplementado con

2.5 ml de L-arabinosa 1M y ampicilina, y se incubaron a 30°C con agitación hasta una D.O._{600nm} de 0.6. Estas células fueron preparadas para una transformación, para lo cual se centrifugaron durante 10 min a 8000 rpm a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 ml de agua fría estéril (se pasó a un tubo eppendorf). Posteriormente se centrifugó durante 5 min a 8000 rpm a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de agua fría estéril, se repitió este paso de lavado 2 veces para finalmente resuspender la pastilla en 100 µl de agua fría estéril. 50 µl de estas células electrocompetentes fueron transformadas por electroporación con 3 µl del producto de PCR concentrado y se incubaron en 1 ml de medio SOC durante 3 horas a 30 °C. Posteriormente se sembraron 300 µl en agar LB adicionado con kanamicina y se incubaron a 42°C durante toda la noche. Las transformantes que se obtuvieron, se resembraron en agar LB adicionado con kanamicina a 42°C con el fin de separar colonias. Finalmente se sembraron en medio LB adicionado con estreptomina, kanamicina y ampicilina, con el fin de analizar resistencias y sensibilidad a los antibióticos.

Para la caracterización de las mutantes con aquellas colonias que fueron resistentes a kanamicina y sensibles a ampicilina se realizaron distintos PCR's con varios juegos de nucleótidos (Tabla 3) que amplifican regiones del gen de resistencia a kanamicina y/o las regiones que los flanquean.

5.11. Ensayo de movilidad en agar

Las cepas a estudiar (Tabla 1) se cultivaron en 5 ml de medio LB adicionado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, 50 µl del inóculo de toda la noche se inocularon en 5 ml de LB y se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm hasta una fase exponencial media (una D.O._{600nm} de aproximadamente 1.0). Muestras de cultivos (1 µl) de las cepas fueron sembradas en agar LB al 0.3%. Las cajas se incubaron durante 7 horas a 37°C. Después de ese tiempo la movilidad fue visualizada como halos de difusión radial alrededor del inóculo inicial.

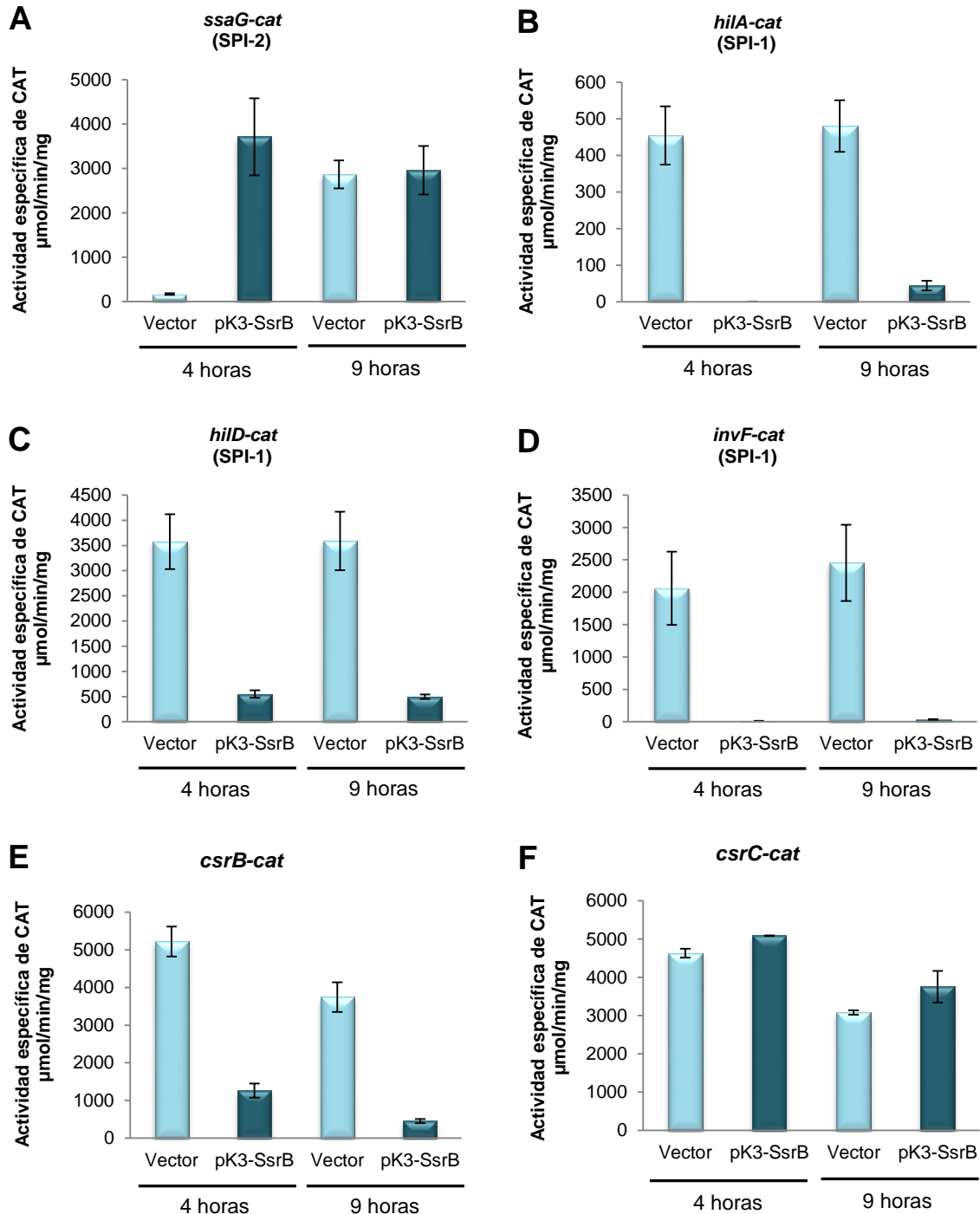
6. RESULTADOS

6.1. SsrB controla negativamente la expresión de los genes de SPI-1

Previamente, en nuestro laboratorio se encontró que la expresión constitutiva de SsrB, el regulador positivo central de los genes de SPI-2, reprime la expresión de *hilA*, codificada en SPI-1 y reprime la secreción de proteínas codificadas en SPI-1 (Fig. 12) (Bustamante *et al.*, no publicado). Esto sugiere que el sistema de dos componentes SsrA/B controla negativamente la expresión de los genes de SPI-1, lo cual podría ser consecuencia de que SsrB reprima la expresión de algún regulador, adicional a *hilA*, de la cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 (Fig. 11).

Para determinar qué genes de dicha cascada de regulación son controlados negativamente por SsrB, se utilizó un plásmido que expresa constitutivamente a SsrB (pK3-SsrB). SsrB al sobre-expresarse es capaz de regular a sus genes blanco independientemente de su estado de fosforilación, por lo que en esta condición no se requiere que SsrA fosforile a SsrB. En primer lugar se analizó el efecto del plásmido pK3-SsrB en la expresión de las fusiones transcripcionales *hilA-cat* (SPI-1), *hilD-cat* (SPI-1), *invF-cat* (SPI-1), *csrB-cat*, *csrC-cat*, *csrA-cat*, *hilE-cat* y *lon-cat*, contenidas en plásmidos, en la cepa *S. Typhimurium* SL1344 WT crecida en medio LB durante 4 h (fase estacionaria temprana) o 9 h (fase estacionaria tardía). Como control se determinó también el efecto del plásmido pK3-SsrB en la expresión de la fusión transcripcional *ssaG-cat* (SPI-2). La expresión del gen *ssaG*, al estar codificado en SPI-2, está regulado positivamente por SsrB. Como se esperaba, en presencia del vector pMPM-K3 la fusión *ssaG-cat* se expresó únicamente en la fase estacionaria tardía (9 h); sin embargo, en presencia del plásmido pK3-SsrB la fusión *ssaG-cat* se expresó también en la fase estacionaria temprana (4 h) (Fig. 18A). Esto indica que el plásmido pK3-SsrB expresa bien a SsrB y que la expresión constitutiva de este regulador adelanta la expresión de los genes de SPI-2 en estas condiciones de crecimiento.

En contraste a lo observado para la fusión *ssaG-cat*, la presencia del plásmido pK3-SsrB reprimió claramente la expresión de las fusiones *hilA-cat*, *hilD-cat*, *invF-cat* y *csrB-cat* y no afectó significativamente la expresión de las fusiones *csrC-cat*, *csrA-cat*, *hilE-cat* y *lon-cat* (Fig. 18B-I). Estos resultados indican que la sobre-expresión de SsrB reprime la expresión de los genes *hilA*, *hilD*, *invF* y *csrB*.



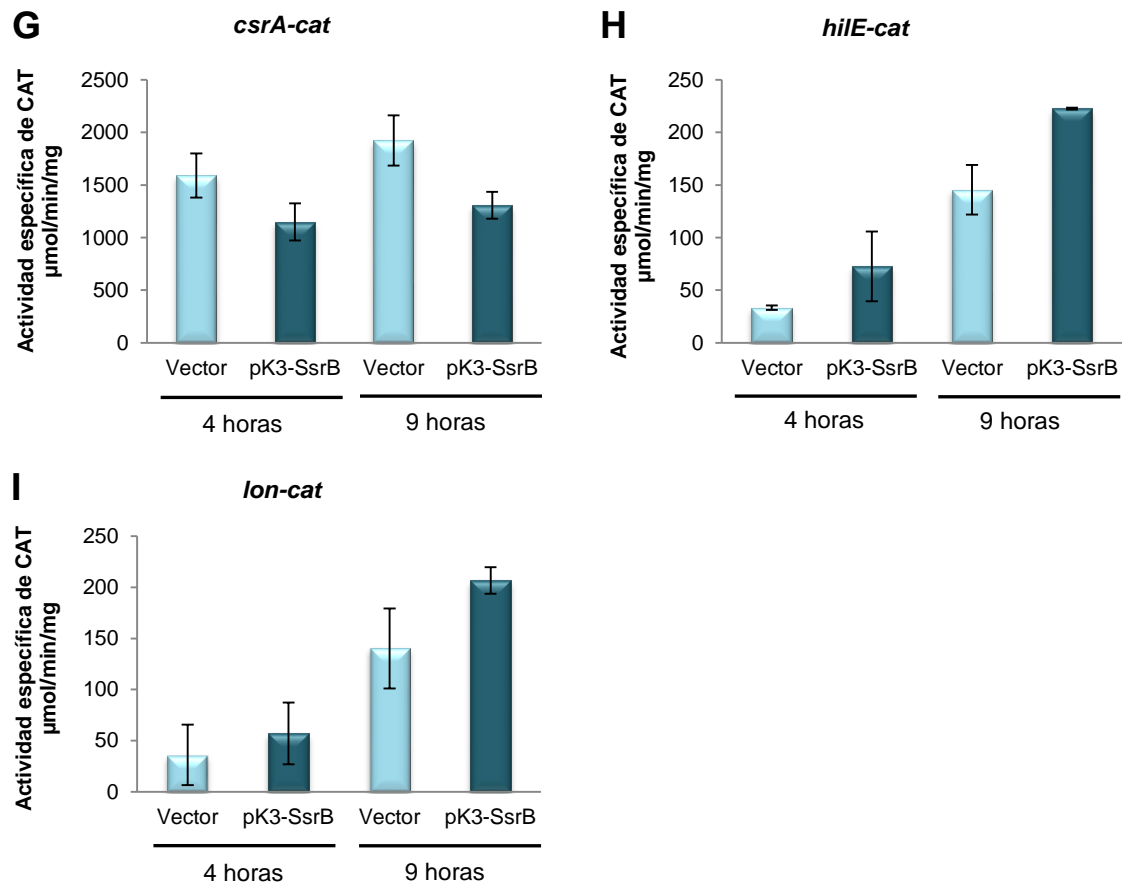
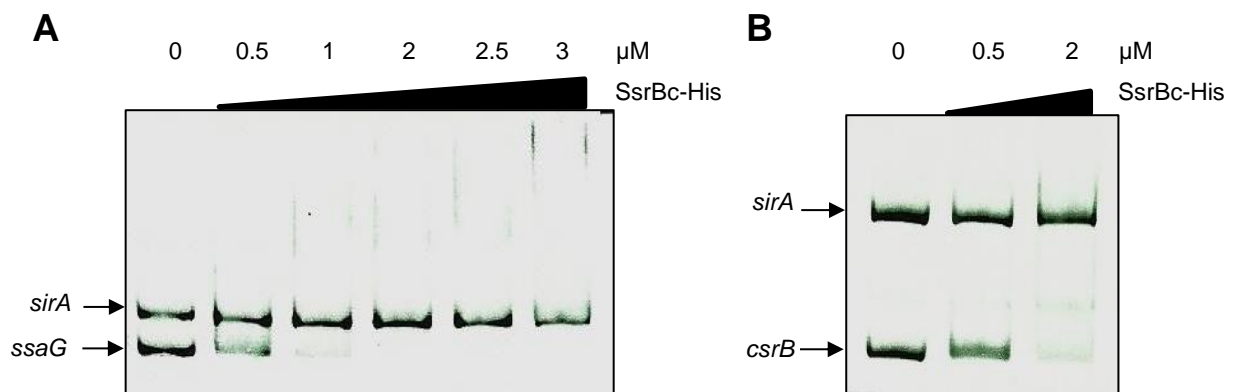


Figura 18. La sobre-expresión de SsrB reprime la expresión de *hilA*, *hilD*, *invF* y *csrB*. La expresión de las fusiones transcripcionales *ssaG-cat* (A), *hilA-cat* (B), *hilD-cat* (C), *invF-cat* (D), *csrB-cat* (E), *csrC-cat* (F), *csrA-cat* (G), *hilE-cat* (H) y *lon-cat* (I), contenidas en los plásmidos *pssaG-cat*, *philA-cat*, *phild-cat*, *pinvF-cat*, *pcsrB-cat*, *pcsrC-cat*, *pcsrA-cat*, *philE-cat* y *plon-cat*, respectivamente, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* conteniendo el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-SsrB, que expresa de manera constitutiva a SsrB. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas (fase estacionaria temprana) y 9 horas (fase estacionaria tardía) en LB a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

6.2. SsrB interactúa con la región reguladora de *csrB*, *hilD* y *hilA*

Para determinar si SsrB reprime directa o indirectamente a los genes *csrB*, *hilD* y *hilA*, analizamos la interacción de SsrB con la región reguladora de estos genes mediante ensayos de retardamiento en gel (EMSA) con DNA. Como

control positivo en estos ensayos se utilizó un fragmento de DNA que contiene la región reguladora de *ssaG*, gen de SPI-2 regulado directamente por SsrB, y como controles negativos fragmentos que contienen las regiones reguladoras de los genes *sirA*, *csrC* y *csrA*, cuya expresión no se afecta por SsrB. La proteína SsrB no se ha podido purificar completa; sin embargo, en estudios previos (Feng *et al.*, 2004; Walthers *et al.*, 2007; Carrol *et al.*, 2009) y en resultados obtenidos en nuestro laboratorio se ha demostrado que la región carboxilo terminal de SsrB, purificada mediante una etiqueta de 6 histidinas (SsrBc-His) y sin fosforilar, se une específicamente a sus genes blanco. La proteína SsrBc-His no se puede fosforilar porque el sitio de fosforilación se encuentra en la región amino terminal de SsrB. Así, en los EMSAs utilizamos una proteína SsrBc-His no fosforilada que ya se había purificado en nuestro laboratorio y se había demostrado que es funcional. La proteína SsrBc-His se unió específicamente a las regiones reguladoras de *ssaG*, *csrB*, *hilD* y *hilA*, a concentraciones entre 0.5 y 2 μ M; en contraste, SsrBc-His no se unió a estas concentraciones a las regiones reguladoras de los genes *csrC*, *csrA* y *sirA* (Fig. 19). Así, en conjunto con los resultados del análisis de expresión, estos resultados indican que SsrB reprime directamente a los genes *csrB*, *hilD* y *hilA*.



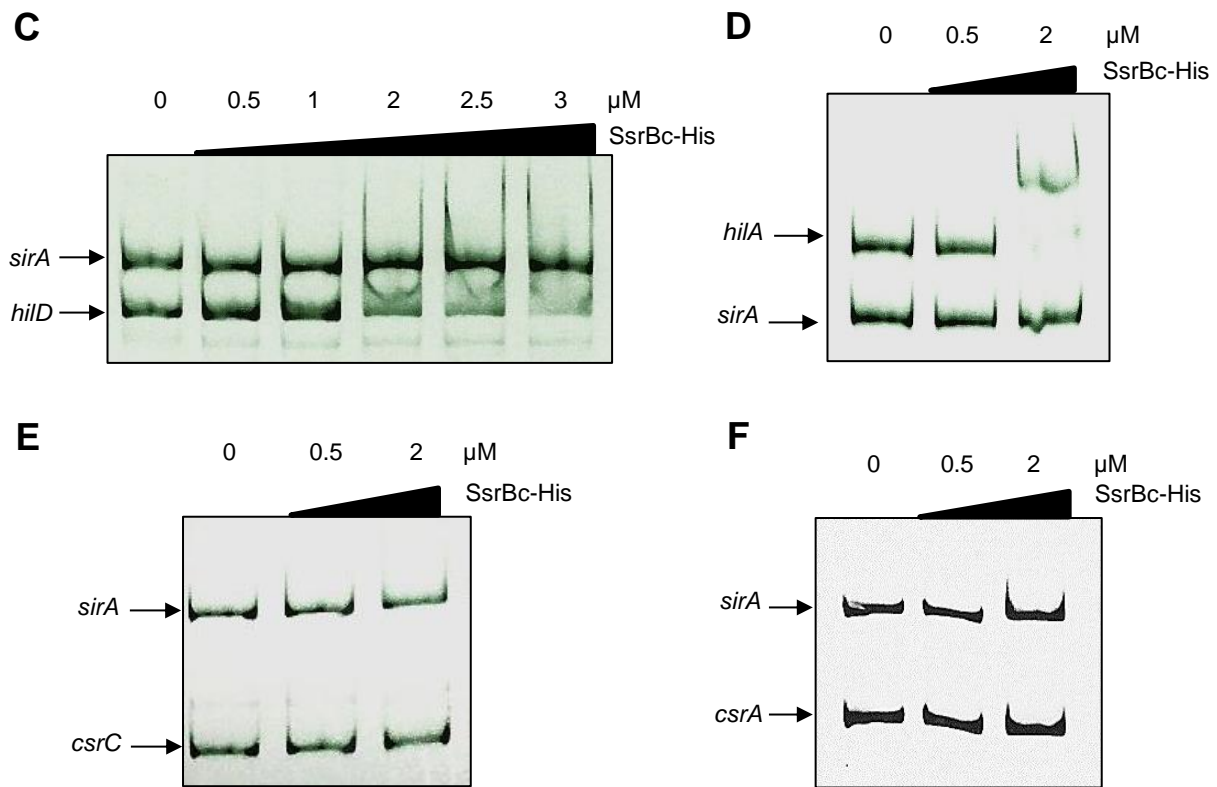


Figura 19. SsrB interactúa directamente con las regiones reguladoras de *csrB*, *hilD* y *hilA*, pero no con las de *sirA*, *csrC* y *csrA*. Se llevaron a cabo EMSAs con las regiones reguladoras de *ssaG*, *csrB*, *hilD*, *hilA*, *csrC*, *csrA* y *sirA*, y con concentraciones crecientes de la proteína purificada SsrBc-His. *ssaG* se usó como un control positivo, dado que ya se ha demostrado que SsrB se une a la región reguladora de este gen; mientras que *csrC*, *csrA* y *sirA* se usaron como controles negativos, ya que su expresión no se afecta por SsrB. *sirA* se incluyó como control negativo interno en todas las reacciones. Los complejos DNA-proteína fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con bromuro de etidio.

6.3. SsrB reprime la expresión de los genes de SPI-1 en ausencia de *csrB*

En estudios previos se ha reportado que en cepas de *S. Typhimurium* que carecen de *csrB* o *csrC* no se afecta significativamente la expresión de los genes de SPI-1, únicamente en una doble mutante $\Delta csrB/\Delta csrC$ se reduce drásticamente la expresión de estos genes. Esto indica que la función de CsrB y CsrC es redundante, al menos en el control de la expresión de los genes de SPI-1 (Fortune *et al.*, 2006; Vogel, 2009; Martínez *et al.*, 2011). Nuestros resultados muestran que

SsrB reprime directamente la expresión de *hilA*, *hilD* y *csrB*, pero no así la expresión de *csrC* (Fig. 18E y 18F). Esto nos podría indicar que la represión de SsrB sobre *csrB* no sería determinante para la represión de los genes de SPI-1, ya que al reprimirse la expresión de *csrB* pero no de *csrC* se esperaría un fenotipo similar al que presenta la mutante $\Delta csrB$, en la que no se afecta de manera significativa la expresión de los genes de SPI-1 (Martínez *et al.*, 2011). Para corroborar esto, se analizó el efecto del plásmido pK3-SsrB tanto en la secreción de proteínas de SPI-1 como en la expresión de la fusión *hilD-cat* en la cepa mutante *S. Typhimurium* $\Delta csrB$. Se observó que la sobre-expresión de SsrB reprime la secreción de proteínas codificadas en SPI-1 así como la expresión de la fusión *hilD-cat* en ausencia de *csrB* (Fig. 20 A y B). Estos resultados indican que aunque SsrB se une y reprime a *csrB*, este efecto de represión no es el que determina la represión de los genes de SPI-1, lo cual es consistente con el hecho de que SsrB se une y reprime también a *hilA* y *hilD* (Fig. 18B y C).

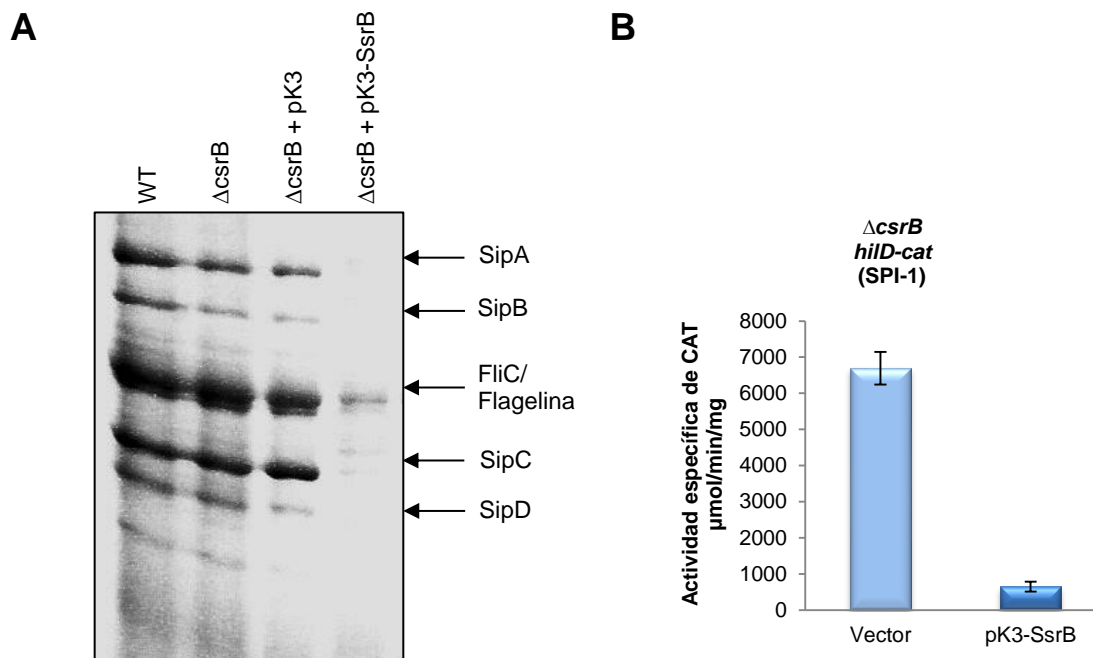
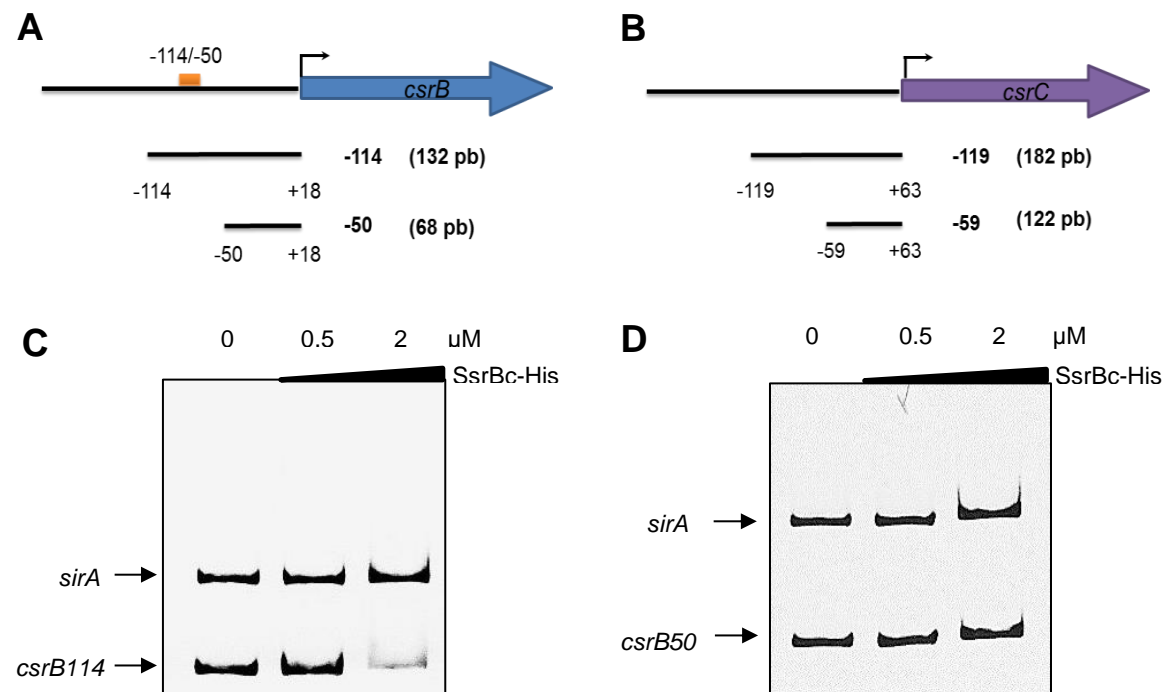


Figura 20. SsrB no requiere de la presencia de CsrB para reprimir la secreción de proteínas codificadas en SPI-1 y la expresión de *hilD*. (A) Perfil de proteínas secretadas de la cepa *S. Typhimurium* SL1344 WT y su derivada mutante $\Delta csrB$ conteniendo o no el vector pMPM-K3 o plásmido pK3-SsrB. Las proteínas SipA, SipB, SipC y SipD se codifican en SPI-1 y se secretan por

el SST3 codificado en esta isla. La proteína FliC es una de las subunidades del flagelo. Las cepas bacterianas se crecieron en LB a 37°C durante 8 horas. (B) Medición de la expresión de la fusión transcripcional *hiiD-cat*, contenida en el plásmido *phiID-cat*, en la cepa de *S. Typhimurium* Δ *csrB* conteniendo el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-SsrB, que expresa de manera constitutiva a SsrB. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas en LB a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

Para comenzar a definir de qué manera SsrB podría reprimir la expresión de *csrB*, se analizó la interacción de SsrB con diferentes segmentos de la región reguladora de *csrB* (Fig. 21A) por medio de EMSAs, utilizando como control negativo a la región reguladora de *sirA* y diferentes segmentos de la región reguladora de *csrC* (Fig. 21B, E y F). SsrB se unió de manera específica al fragmento que contiene de la posición -114 a la +18 de la región reguladora de *csrB*, pero no al fragmento que contiene de la posición -50 a la +18 (Fig. 21 C y D). Estos resultados indican que SsrB se une a una secuencia localizada entre las posiciones -114 a -50 de la región reguladora de *csrB*. Recientemente se localizó en esta región de *csrB* un sitio de unión del regulador IHF (Martínez *et al.*, 2014).



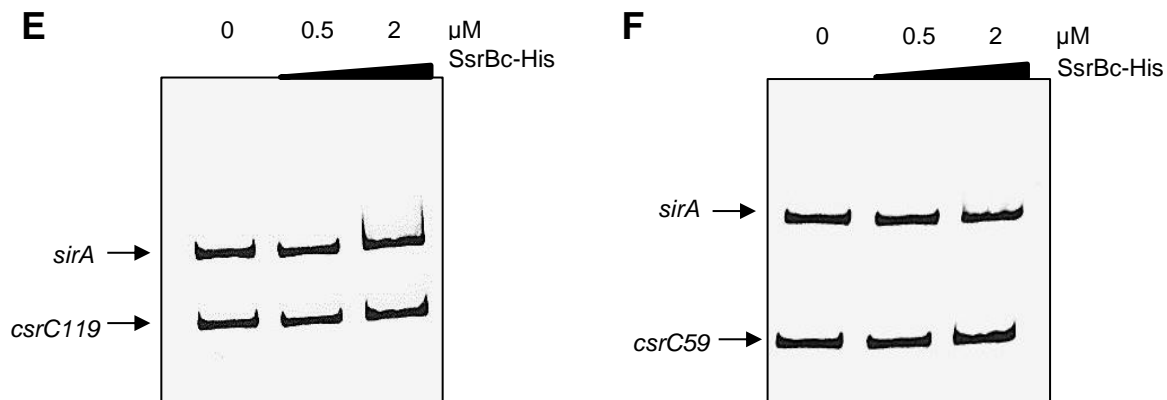


Figura 21. SsrB interactúa directamente con la región reguladora de *csrB* comprendida entre la posición -114 y -50 con respecto al inicio de la transcripción de este gen. (A y B) Fragmentos de diferente tamaño de la región reguladora de *csrB* (región -114 a +18 y región -50 a +18) y de la región reguladora de *csrC* (región -119 a +63 y región -59 a +63) utilizados en los EMSAs. A la derecha se indica el nombre del fragmento, así como su tamaño en pb. (C, D, E y F) Se llevaron a cabo EMSAs con los fragmentos de DNA que contienen las diferentes regiones reguladoras de *csrB* y *csrC*, los cuales fueron incubados con concentraciones crecientes de la proteína purificada SsrBc-His. La región reguladora de *sirA* fue usada como control negativo. Los complejos DNA-proteína fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con bromuro de etidio.

6.4. SsrB reprime la expresión del promotor de *hilD*

Nuestros resultados indican que SsrB reprime a *hilD* (Fig. 18C) y se une a la región reguladora de este gen (Fig. 19C). Estos datos sugieren un control directo de SsrB sobre *hilD*. Sin embargo, dado que Hile y Lon controlan postranscripcionalmente a *hilD* (Takaya *et al.*, 2002; Ellermeier *et al.*, 2005), pudiera ser que SsrB actuase a través de uno de estos reguladores. No obstante, nuestros resultados muestran que SsrB no afecta la expresión de *hilE* o *lon* (Fig. 18H e I). Para comprobar esta regulación directa sobre *hilD*, analizamos el efecto del plásmido pK3-SsrB sobre la expresión de la fusión *hilD-cat* en las cepas mutantes *S. Typhimurium* $\Delta hilE$ y Δlon , en las que se siguió observando la represión de la expresión de *hilD* (Fig. 22). Lo anterior indica que SsrB no actúa a través de Hile y Lon para reprimir la expresión de *hilD*, sino que lo hace de forma directa.

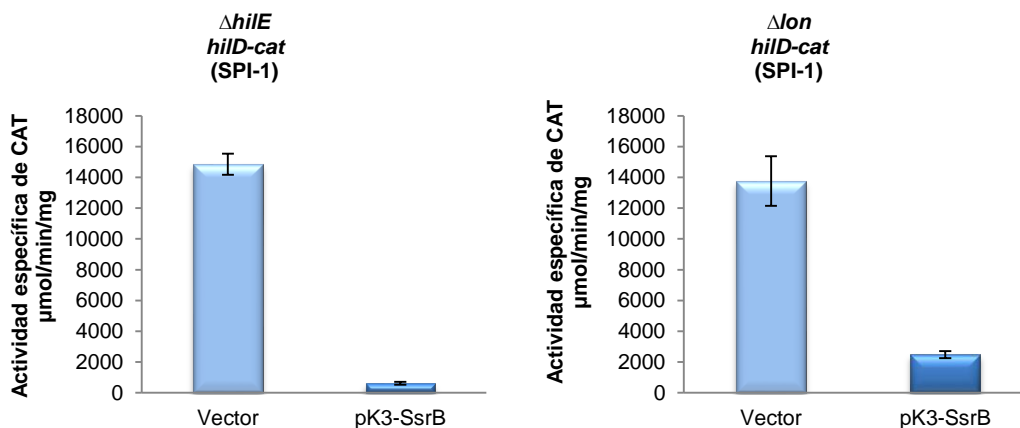


Figura 22. SsrB no requiere de Hile y Lon para reprimir a *hilD*. La expresión de la fusión transcripcional *hilD-cat*, contenida en el plásmido *philD-cat*, se monitoreó en las cepas mutantes de *S. Typhimurium* $\Delta hilE$ y Δlon conteniendo el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-SsrB, que expresa de manera constitutiva a SsrB. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas en LB a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

Para determinar la secuencia necesaria para la represión de *hilD* por *ssrB*, se comenzó por analizar el efecto de SsrB sobre dos fusiones transcripcionales que contienen diferentes segmentos de la región reguladora de *hilD* (Fig. 23A). La fusión *hilD-cat-108*, que contiene todos los elementos de regulación de *hilD*, incluyendo la secuencia necesaria para su autorregulación, y la fusión *hilD-cat-48*, que carece de la región corriente arriba del promotor de *hilD* y por lo tanto ya no está sujeta a la autorregulación. En ausencia de la autorregulación, hay una expresión transcripcional basal de *hilD* que ya no se regula por Hile, Lon o CsrA. Primero se determinó la expresión de estas fusiones en la cepa WT de *S. Typhimurium* y en su derivada $\Delta hilD$. Como se esperaba, la expresión de la fusión *hilD-cat-108* disminuye en la cepa mutante con respecto a su actividad en la cepa WT, mientras que la fusión *hilD-cat-48* presentó un nivel basal de expresión similar en ambas cepas (Fig. 23B). Posteriormente se analizó el efecto del plásmido pK3-SsrB sobre la expresión de estas fusiones en la cepa WT de *S. Typhimurium*. La sobre-expresión de SsrB reprimió la expresión de las fusiones *hilD-cat-108* y *hilD-*

cat-48 (Fig. 23C y D). Consistente con estos resultados, mediante un experimento de EMSA se demostró que SsrB interacciona con el segmento de la región reguladora que abarca las posiciones -48 a +88 de *hilD* (Fig. 23E), el cual carece de la secuencia necesaria para la autoregulación.

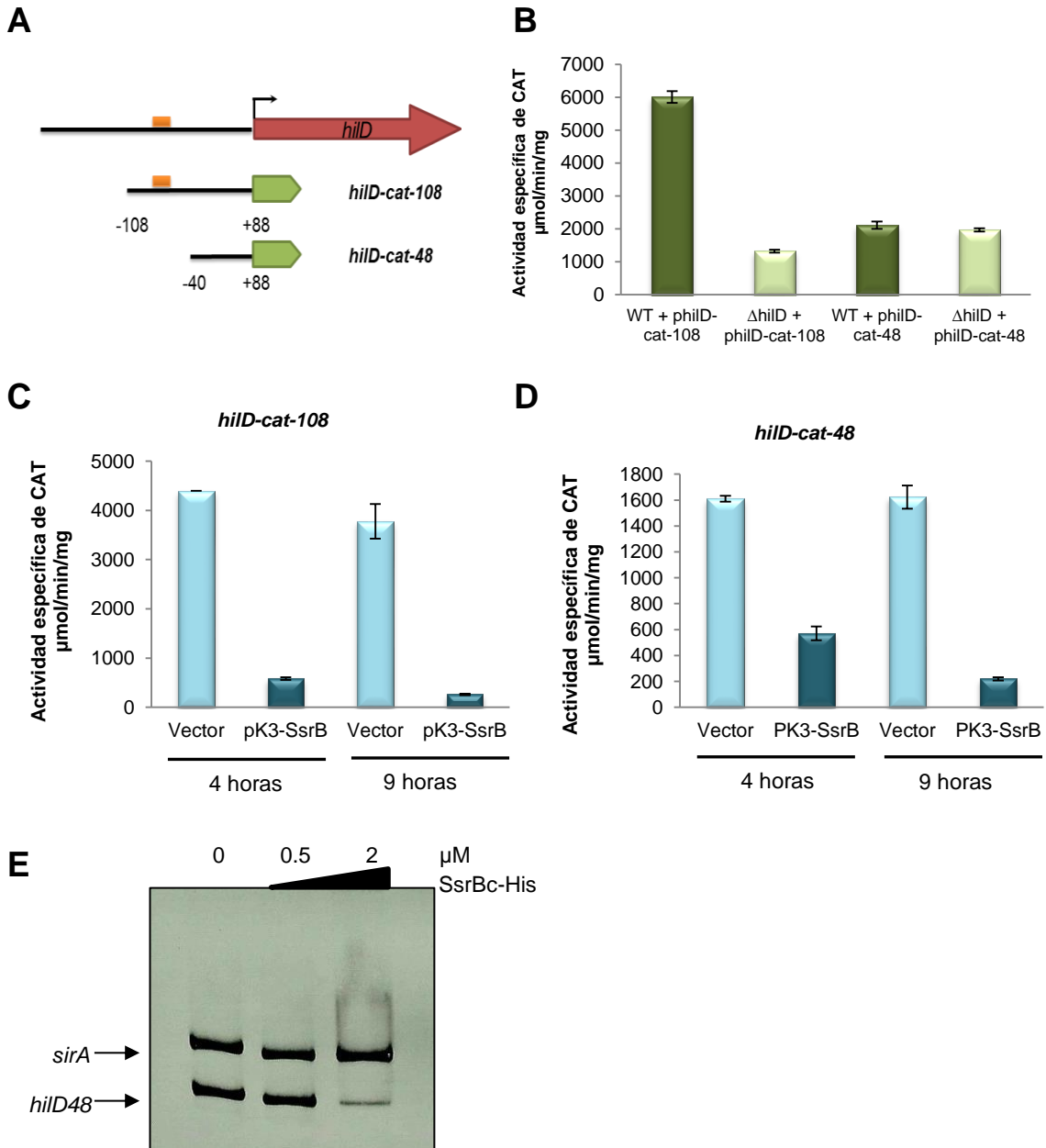
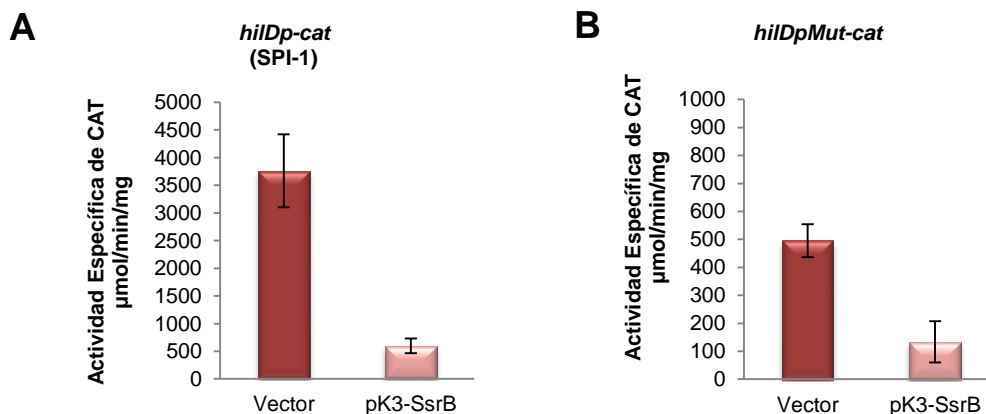


Figura 23. SsrB requiere de la región entre las posiciones -48 y +88 para regular a *hilD*. (A) Mapa de las fusiones transcripcionales que contienen diferentes regiones de la región reguladora de *hilD*. (B) La expresión de las fusiones transcripcionales *hilD-cat-108* y *hilD-cat-48*, contenidas en los plásmidos *philD-cat-108* y *philD-cat-48*, respectivamente, se determinó en la cepa WT de *S.*

S. Typhimurium y su derivada mutante $\Delta hilD$. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas (fase estacionaria temprana) en LB a 37°C. (C y D) Asimismo, la expresión de las fusiones transcripcionales *hilD-cat-108* y *hilD-cat-48* se determinó en la cepa WT *S. Typhimurium* conteniendo el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-SsrB. En este caso la actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas (fase estacionaria temprana) y 9 horas (fase estacionaria tardía) en LB a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. (E) EMSA usando un fragmento de la región reguladora de *hilD* que abarca de la posición -48 a +88 con respecto al sitio de inicio de la transcripción, utilizando concentraciones crecientes de la proteína purificada SsrBc-His (0, 0.5 y 2 μ M). Los complejos DNA-proteína fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con bromuro de etidio. El fragmento de *sirA* fue utilizado como control negativo interno.

Por lo anterior, se decidió evaluar el efecto de SsrB sobre una fusión transcripcional que abarcara la región promotora mínima de *hilD* (Fig. 15). Para esto se construyó la fusión *hilDp-cat*, que contiene un fragmento de la región reguladora de *hilD* que va de la posición -37 a la +6 (ver Materiales y Métodos), y se analizó el efecto del plásmido pK3-SsrB sobre la expresión de esta fusión en la cepa WT de *S. Typhimurium*. La sobre-expresión de SsrB reprimió la expresión de la fusión *hilDp-cat* (Fig. 24A) y por medio de un experimento de EMSA se demostró que SsrB interacciona con este segmento de la región reguladora (Fig. 24D y E), lo cual indica que SsrB reprime la expresión de *hilD* actuando sobre la secuencia contenida entre las posiciones -37 a la +6 de la región reguladora de este gen.



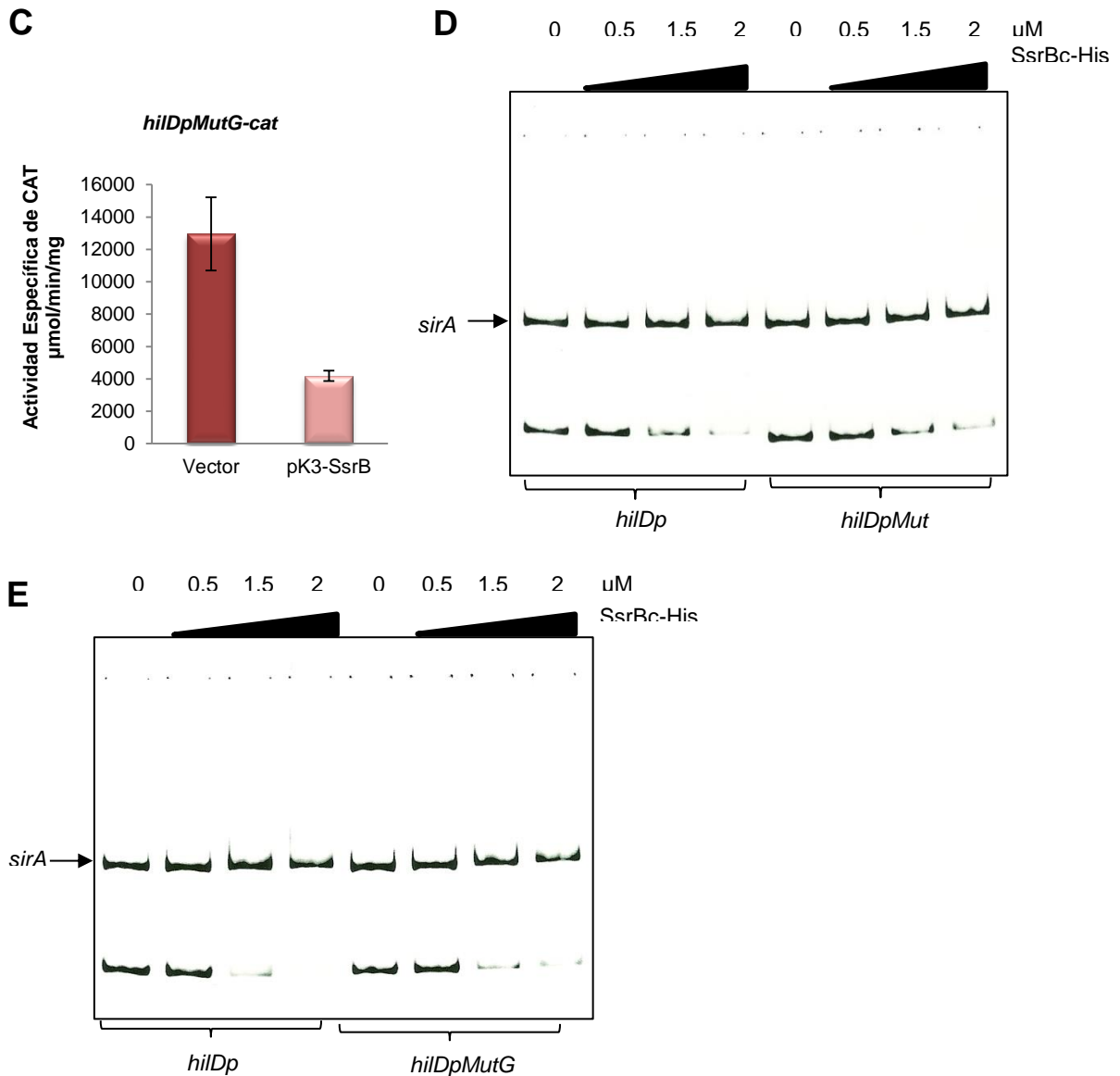


Figura 24. SsrB reprime al promotor de *hilD* al interactuar directamente con la secuencia contenida entre las posiciones -37 a la +6 de la región reguladora de este gen. La expresión de las fusiones transcripcionales *hilDp-cat* (A), *hilDpMut-cat* (B) y *hilDpMutG-cat* (C), contenidas en los plásmidos *philDp-cat*, *philDpMut-cat* y *philDpMutG-cat*, respectivamente, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* conteniendo el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-SsrB. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas en LB a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Asimismo, se llevaron a cabo EMSAs usando el fragmento de la región reguladora de *hilDp* y *hilDpMut* (D), y de *hilDp* y *hilDpMutG* (E), con concentraciones crecientes de la proteína purificada SsrBc-His. *sirA* se incluyó como control negativo interno en todas las reacciones. Los complejos DNA-proteína fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con bromuro de etidio.

Solamente se ha reportado una secuencia consenso que reconoce SsrB en sus genes blanco de SPI-2 (Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010), la cual es un heptámero (Fig. 8). Con base en esto, se localizó una posible secuencia de unión de SsrB en la región reguladora de *hilD*, entre las posiciones -21 a -27, que se localiza entre las secuencias -35 y -10 del promotor. Este posible sitio de unión de SsrB en *hilD* (CTCAGAT) se mutó (CTTAAGC) y se analizó el efecto de esto en la interacción y regulación de SsrB sobre *hilD*. De esta manera se obtuvo la fusión *hilDpMut-cat*, que contiene el mismo fragmento de la región reguladora de *hilD* que la fusión *hilDp-cat* (de la posición -37 a la +6), pero con cuatro cambios en sus bases de las posiciones -21 (T por C), -22 (A por G), -23 (G por A) y -25 (C por T) (ver Materiales y Métodos), y se analizó el efecto del plásmido pK3-SsrB sobre la expresión de esta fusión en la cepa WT de *S. Typhimurium*. Asimismo, por medio de un EMSA, se analizó si estas mutaciones afectan la interacción de SsrB con este segmento de la región reguladora de *hilD*. La sobre-expresión de SsrB reprimió la expresión de la fusión *hilDpMut-cat* (Fig. 24B) y se demostró que SsrB aún es capaz de interaccionar con este segmento de la región reguladora a pesar de las mutaciones que contiene (Fig. 24D). Estos resultados muestran que la región mutada no es necesaria para la represión de *hilD* mediada por SsrB. Algo importante a resaltar es que el nivel de expresión de la fusión *hilDpMut-cat* fue considerablemente más bajo que el de la fusión silvestre *hilDp-cat*, lo cual indica que la región mutada sí es importante para la adecuada expresión del promotor de *hilD*.

Con un análisis más minucioso se localizó otro posible sitio de unión de SsrB en el promotor de *hilD* entre las posiciones -7 a -13, que se sobrepone a la región -10. Se decidió mutar los dos probables sitios de unión de SsrB en *hilD*, y para tratar de evitar que se afectara la expresión del promotor, se cambió solamente la base más conservada (G) con respecto al consenso para ambos sitios. De esta forma se obtuvo la fusión *hilDpMutG-cat*, la cual lleva los dos cambios en sus bases de las posiciones -9 (G por A) y -23 (G por A) (ver Materiales y Métodos), y se determinó el efecto del plásmido pK3-SsrB en la expresión de esta fusión, en la cepa WT de *S. Typhimurium*. En presencia del

vector pMPM-K3 la expresión de la fusión *hilDpMutG-cat* fue mayor que la expresión mostrada por la fusión silvestre *hilDp-cat*, esto puede deberse a que la mutación en la posición -9 (G por A) mejoró el consenso de la región -10. Sin embargo, la presencia del plásmido pK3-SsrB disminuyó la expresión de la fusión *hilDpMutG-cat* (Fig. 24C). Asimismo, SsrB fue capaz de interactuar con la región reguladora de *hilD* contenida en la fusión *hilDpMutG-cat* (Fig. 24E). Estos resultados indican que las regiones de las secuencias mutadas no son necesarias para la represión de *hilD* por SsrB.

En conjunto, nuestros resultados indican que SsrB reprime la transcripción de *hilD* uniéndose a la secuencia que contiene al promotor, localizada entre las posiciones -37 a +6. Además, nuestros resultados muestran que la mutación de dos posibles sitios de unión de SsrB en la región reguladora de *hilD*, los cuales se localizaron con base a la secuencia consenso de unión a DNA que se ha reportado para SsrB, no afecta la represión de *hilD* mediada por SsrB.

6.5. SsrB regula negativamente a *hilA* en ausencia de *hilD* y *hns*

HilD induce la expresión de *hilA* actuando como anti-represor de H-NS (Schechter *et al.*, 2003), por lo que para corroborar que SsrB puede reprimir directamente a *hilA*, se analizó el efecto del plásmido pK3-SsrB sobre la fusión *hilA-cat* en la cepa mutante de *S. Typhimurium* $\Delta hilD/\Delta cthns$, la cual carece de HilD y expresa una forma truncada no funcional de H-NS. La sobre-expresión de SsrB reprimió la expresión de la fusión *hilA-cat* en este fondo genético (Fig. 25A), confirmando con esto que SsrB reprime directamente la expresión de *hilA*. La sobre-expresión de SsrB también reprimió la expresión de las fusiones *hilD-cat* y *csrB-cat* en la cepa mutante $\Delta hilD/\Delta cthns$ (Fig. 25B y C), indicando que los reguladores HilD y H-NS no están involucrados en la represión de *hilD* y *csrB* mediada por SsrB.

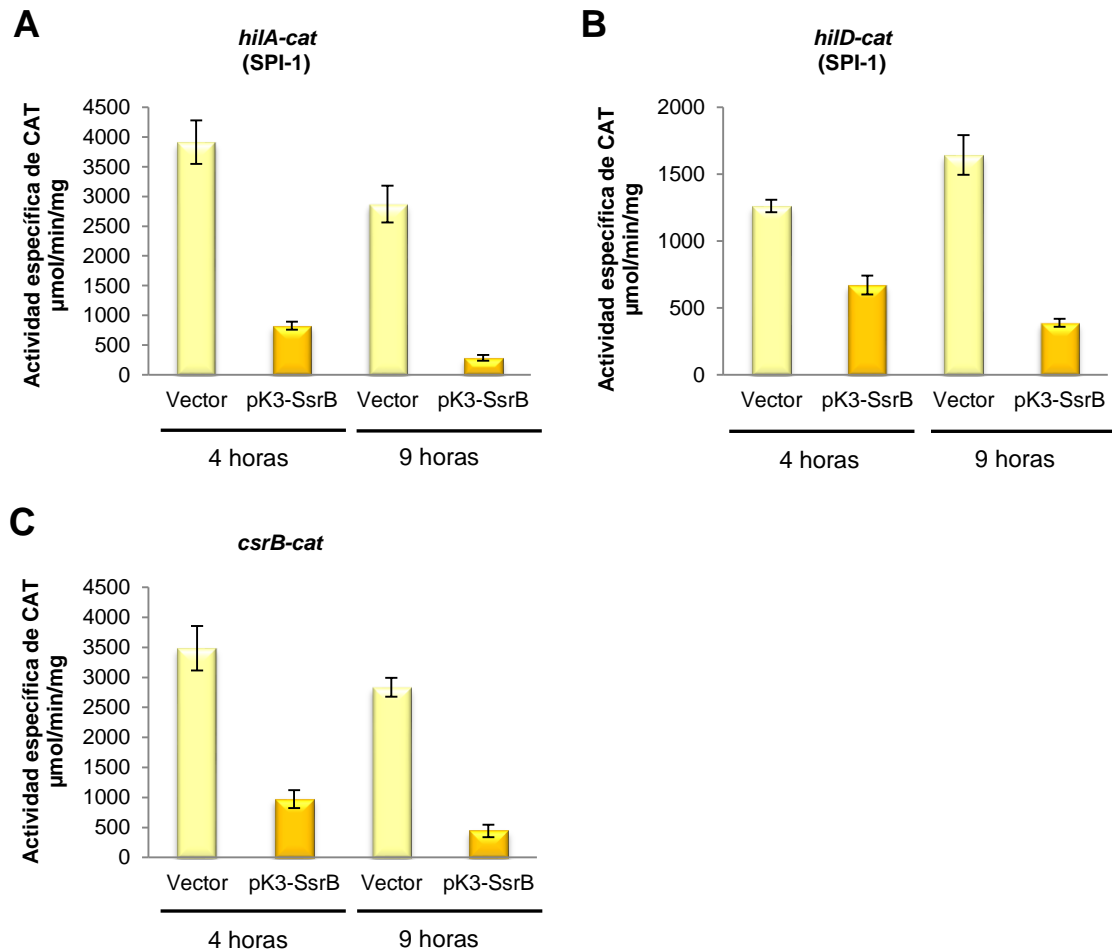


Figura 25. SsrB reprime en ausencia de *hilD* y *hns* la expresión de *hilA*, *hilD* y *csrB*. La expresión de las fusiones transcripcionales *hilA-cat* (A), *hilD-cat* (B) y *csrB-cat* (C), contenidas en los plásmidos *phlA-cat*, *phlD-cat* y *pcsrB-cat*, respectivamente, se monitoreó en la cepa *S. Typhimurium* Δ *hilD*/ Δ *cthns* conteniendo el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-SsrB, que expresa de manera constitutiva a SsrB. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas (fase estacionaria temprana) y 9 horas (fase estacionaria tardía) en LB a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

6.6. En ausencia de SsrB se obtiene únicamente una ligera des-represión de los genes de SPI-1

Nuestros resultados mostrados anteriormente indican que la sobre-expresión de SsrB reprime de manera directa a *csrB*, *hilD* y *hilA*, lo cual conlleva a la represión de los genes de SPI-1. Con base en esto, se podría esperar que la expresión de los genes de SPI-1 se des-reprima en una mutante Δ *ssrB*, sobre todo en las condiciones de crecimiento en las que se induce la expresión de SsrB y se reprime la expresión de los genes de SPI-1. Para investigar esto, se determinó la expresión de las fusiones *hilA-cat* e *invF-cat* en la cepa WT de *S. Typhimurium* y en su derivada mutante Δ *ssrB*, crecidas en los medios LB y MM-N. Como un control, se determinó también la expresión de la fusión *ssaG-cat* en estas cepas, ya que la expresión de *ssaG* se controla positivamente por SsrB.

Como era esperado, la expresión de la fusión *ssaG-cat* disminuyó drásticamente en la mutante Δ *ssrB* con respecto a su expresión en la cepa WT, en las diferentes condiciones de crecimiento probadas (Figs. 26A, 27A, 29A y 32A; Tabla 5), ya que SsrB regula positivamente a *ssaG*. En contraste, las fusiones *hilA-cat* e *invF-cat* se expresaron de manera similar en la cepa WT y su derivada mutante Δ *ssrB* crecidas en medio LB, pero no se expresaron en estas cepas crecidas en MM-N (Fig. 26B y C). Estos resultados indican que en estas condiciones de crecimiento la expresión de los genes de SPI-1 no se des-reprime en ausencia de SsrB.

Ya que una de las condiciones que favorecen la expresión de los genes de SPI-2 dentro de macrófagos es el pH ácido, se decidió probar el medio MM-N con pH de 5.8. Sin embargo, tampoco se observó des-represión de la fusión *hilA-cat* en la mutante Δ *ssrB* en estas condiciones de crecimiento (Fig. 27).

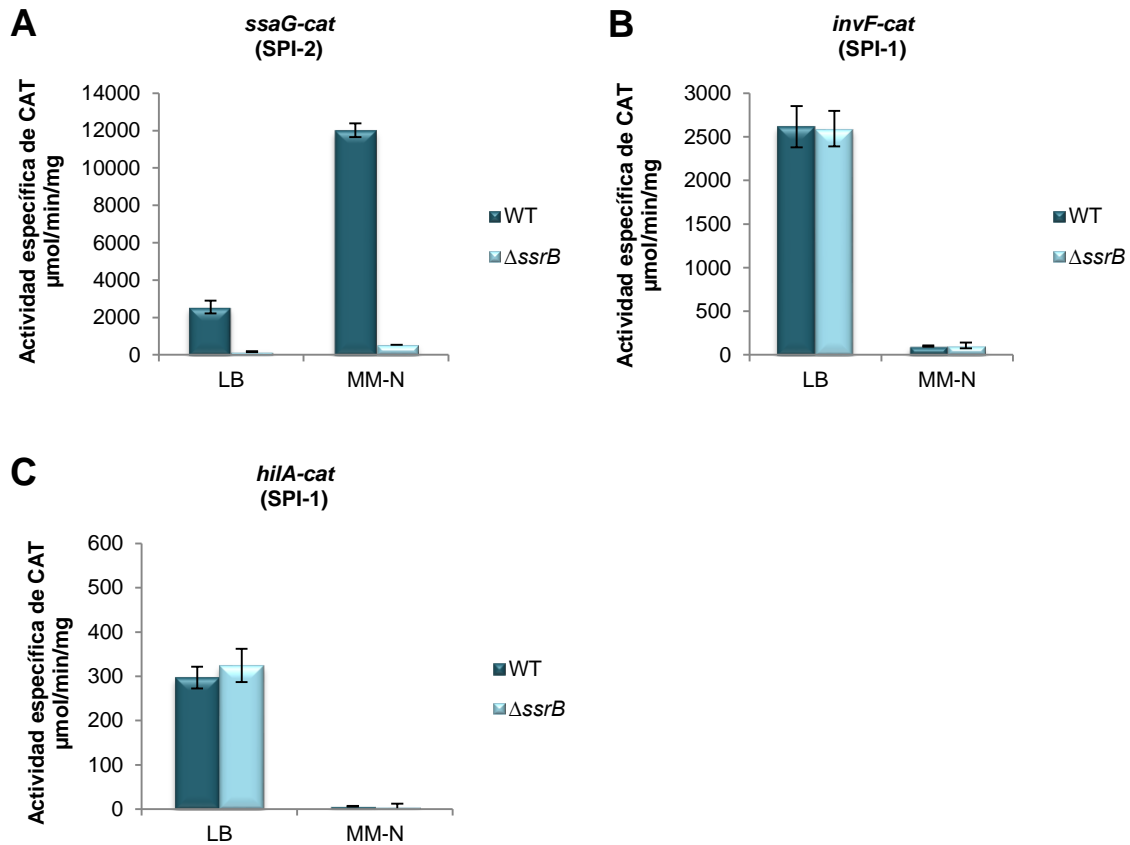


Figura 26. Los genes de SPI-1 no se des-reprimen en ausencia de SsrB en medio LB ni en MM-N. La expresión de las fusiones transcripcionales *ssaG-cat* (A), *invF-cat* (B) y *hilA-cat* (C), contenidas en los plásmidos *pssaG-cat*, *pinvF-cat* y *philA-cat*, respectivamente, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* y su derivada Δ *ssrB*. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas (fase estacionaria temprana), para los genes de SPI-1, o 9 horas (fase estacionaria tardía), para *ssaG* (SPI-2), en LB a 37°C o durante 16 horas en MM-N a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

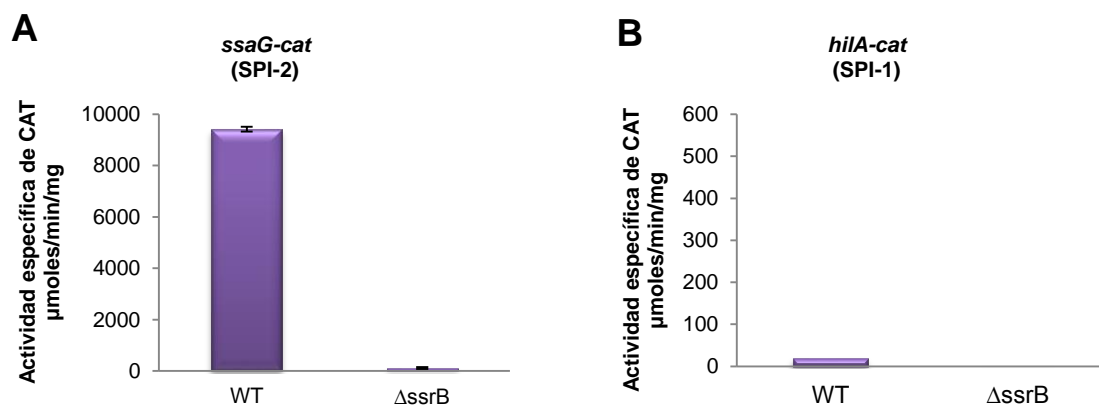


Figura 27. Los genes de SPI-1 no se des-reprimen en ausencia de SsrB en medio MM-N a pH ácido. La expresión de las fusiones transcripcionales *ssaG-cat* (A) y *hilA-cat* (B), contenidas en los plásmidos *pssaG-cat* y *philA-cat*, respectivamente, se determinó en muestras de cultivos de la cepa WT de *S. Typhimurium* y su derivada mutante $\Delta ssrB$ crecidas a 37°C durante 16 horas en MM-N a pH 5.8. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

Recientemente, el grupo de Hinton y col. nos proporcionó información de sus resultados de transcriptomas de la cepa WT ST4/74 de *S. Typhimurium* y sus derivadas mutantes $\Delta ssrB$ y $\Delta slyA$. Estos resultados muestran que la expresión de los genes de SPI-1, incluidos *hilD*, *hilA* e *invF* (Fig. 28B, C y D), se des-reprimen en las mutantes $\Delta ssrB$ y $\Delta slyA$, con respecto a su expresión en la cepa WT, cuando las cepas se crecen en el medio mínimo PCN. En estos experimentos, la expresión de los genes se analizó en muestras de cultivos crecidos en medio PCN hasta una D.O._{600 nm} de 0.3, lo cual se obtuvo en aproximadamente 7 horas de crecimiento. SlyA es un regulador que controla positivamente al operón *ssrAB* (Navarre *et al.*, 2005; Fass and Groisman, 2009). En nuestro grupo hemos visto que la sobre-expresión de SlyA en la cepa WT *S. Typhimurium* SL1344, también reprime a los genes de SPI-1.

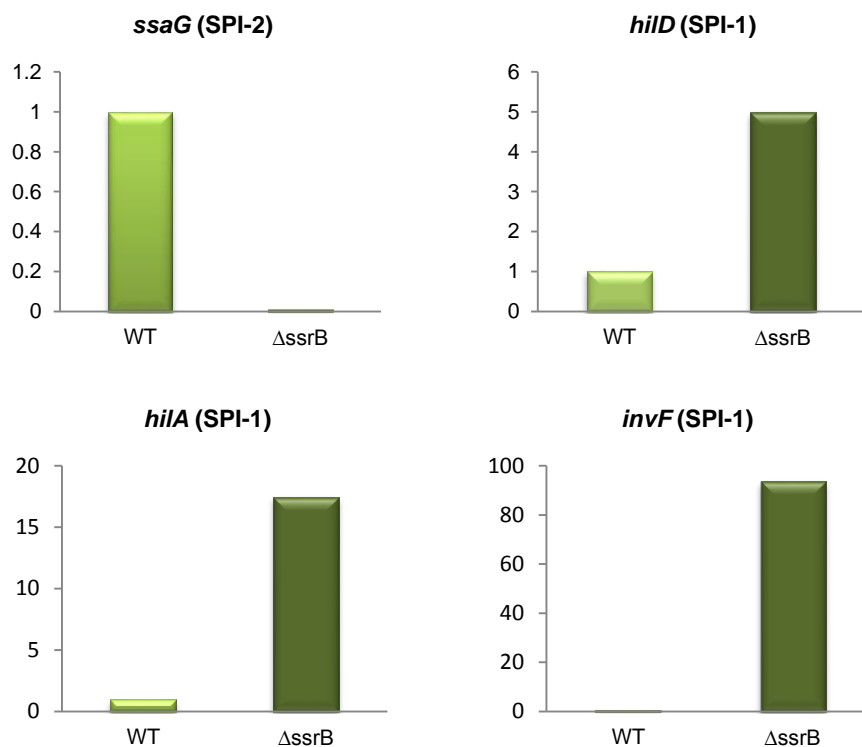


Figura 28. En experimentos de RNA-seq se detecta la des-represión de los genes de SPI-1 en ausencia de SsrB. La expresión de los genes *hilD*, *hilA* e *invF*, se des-reprime en la mutante $\Delta ssrB$ con respecto a su expresión en la cepa WT en un análisis por transcriptomas en la cepa ST4/74 de *S. Typhimurium*. La expresión de los genes se analizó en muestras de cultivos crecidos en medio PCN hasta una D.O._{600 nm} de 0.3 por medio de experimentos de RNAseq. Como control se evaluó la expresión del gen *ssaG*. La escala de cada figura es en base al nivel de expresión relativa en la cepa $\Delta ssrB$ con respecto a la cepa WT (Hinton *et al.*, datos no publicados).

Con base en esta información, se decidió determinar la expresión de las fusiones *hilA-cat* y *hilD-cat* en la cepa WT y su derivada mutante $\Delta ssrB$ crecidas en el medio PCN. Sin embargo, en las primeras 12 horas no hubo crecimiento de las cepas, así que los cultivos se tuvieron que dejar 24 horas en incubación, tiempo en el que se pudieron tomar muestras para el análisis de expresión de las fusiones. En estas condiciones tampoco se observó des-represión de las fusiones *hilA-cat* y *hilD-cat* en la mutante $\Delta ssrB$ (Tabla 5, 24 horas de crecimiento).

La cepa de *S. Typhimurium* que han usado en el grupo de Hinton para la obtención de los transcriptomas, ST4/74, es la cepa parental de la cepa SL1344, que usamos en nuestro laboratorio. El genotipo de la cepa SL1344 muestra que

ésta presenta auxotrofia a histidina, por lo que se determinó el crecimiento de nuestras cepas en el medio PCN suplementado con histidina. La cepa SL1344 creció mejor en el medio PCN con histidina, aunque los cultivos alcanzaron una D.O._{600 nm} de 0.3 hasta las 10 horas de crecimiento. En estos experimentos se utilizó un medio PCN preparado con reactivos que se tenían en nuestro laboratorio, algunos de los cuales ya se encontraban hidratados. En estos ensayos se analizó la expresión de las fusiones *hilA-cat* e *invF-cat*, en la cepa SL1344 crecida en medio PCN con histidina; sin embargo, tampoco se observó des-represión de estas fusiones en la mutante Δ *ssrB* (Tabla 5, Reactivos antiguos).

Tabla 5. Expresión de las fusiones transcripcionales *ssaG-cat*, *hilA-cat*, *hilD-cat* e *invF-cat* en muestras de cultivos de la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y su derivada mutante Δ *ssrB* crecidas en PCN. Los valores corresponden al promedio de la actividad específica de CAT (μ mol/min/mg) de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

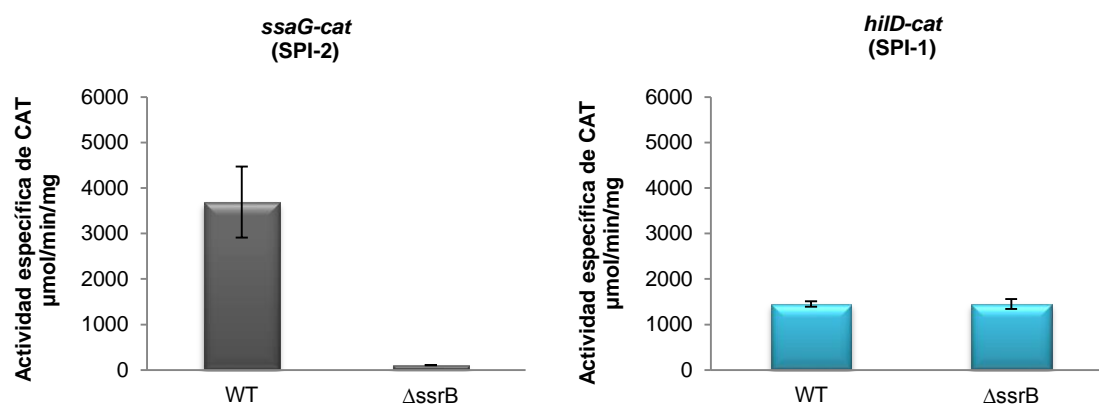
Fusión transcripcional	Cepa	CONDICIÓN			
		24 horas de crecimiento	Crecimiento hasta una D.O. _{600 nm} : 0.3*		
			Reactivos antiguos	Matraces nuevos	Reactivos de adquisición reciente
<i>ssaG-cat</i>	WT	5580.8	3172.6	2635.5 ± 307	3211.6 ± 476.7
	Δ <i>ssrB</i>	163.5	124.3	123.9 ± 11.6	162.9 ± 27.7
<i>hilA-cat</i>	WT	237.8 ± 14.6	0	ND**	ND**
	Δ <i>ssrB</i>	343.7 ± 162.3	13.6	ND**	ND**
<i>hilD-cat</i>	WT	3449.1 ± 689.1	ND**	1398.1 ± 54.1	1810.9 ± 65.4
	Δ <i>ssrB</i>	2002.1 ± 187.1	ND**	1319.9 ± 168.1	1830.2 ± 171.7
<i>invF-cat</i>	WT	ND**	13.5	22.4 ± 4.2	43.8 ± 20.8

Δ ssrB	ND**	12.7	42.7 ± 33	57.3 ± 23.9
---------------	------	------	-----------	-------------

* Medio PCN suplementado con histidina

** ND: No se determinó

Debido a que el crecimiento de nuestra cepa seguía siendo más lento que lo reportado por el grupo de Hinton, creímos que alguno de los componente que usamos nosotros para preparar el medio PCN no estaba funcionando adecuadamente. Por lo cual en ensayos posteriores se analizaron las fusiones *hilD-cat* e *invF-cat* probando diferentes condiciones, como fue preparar el medio con reactivos de adquisición reciente y crecer los cultivos en matraces nuevos (Tabla 5, Matraces nuevos y Reactivos de adquisición reciente), con base a recomendaciones hechas por el grupo de Hinton. También se disminuyó la concentración utilizada de Mg^{2+} de 1 mM a 10 μ M en el medio, ya que en una consulta con el grupo de Hinton, nos mencionaron que usaban una concentración menor de este componente. Sin embargo, en todas las condiciones analizadas no se observó la des-represión de los genes de SPI-1 en ausencia de SsrB (Tabla 5 y Fig. 29).



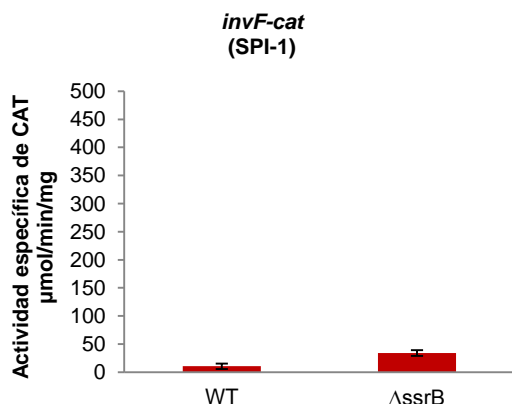


Figura 29. Los genes de SPI-1 no se des-reprimen en ausencia de SsrB en medio PCN. La expresión de las fusiones transcripcionales *ssaG-cat*, *hilD-cat* e *invF-cat*, contenidas en los plásmidos *pssaG-cat*, *philD-cat* y *pinvF-cat*, respectivamente, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* y su derivada mutante Δ *ssrB*. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras de cultivos bacterianos crecidos a D.O._{600 nm} de 0.3 en medio PCN con una concentración de Mg^{2+} de 10 μ M a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

Para descartar que fuera el uso de fusiones transcripcionales lo que nos impide observar el efecto de des-represión de los genes de SPI-1 en ausencia de SsrB, se monitoreó la expresión de InvF en medio LB (fase estacionaria temprana y tardía) y PCN mediante un experimento de Western blot, usando la cepa *S. Typhimurium* WT y su derivada mutante Δ *ssrB* que expresan a InvF etiquetada con el epítipo FLAG. Como era esperado, en la cepa WT el nivel de expresión de InvF-FLAG fue mayor a la hora 4 que a la hora 9 del crecimiento en el medio LB, y no se detectó su expresión en las bacterias crecidas en el medio PCN (Fig. 30, panel que muestra una baja exposición de la película). Sin embargo, no se observó un cambio en la expresión de InvF-FLAG entre la cepa WT y la cepa Δ *ssrB*, lo cual concuerda con nuestros resultados obtenidos usando fusiones transcripcionales. Aunque, en una mayor exposición de la película se alcanza a detectar un bajo nivel de expresión de InvF-FLAG en la mutante Δ *ssrB*, pero no en la cepa WT, crecidas en el medio PCN (Fig. 30, panel que muestra una alta exposición de la película).

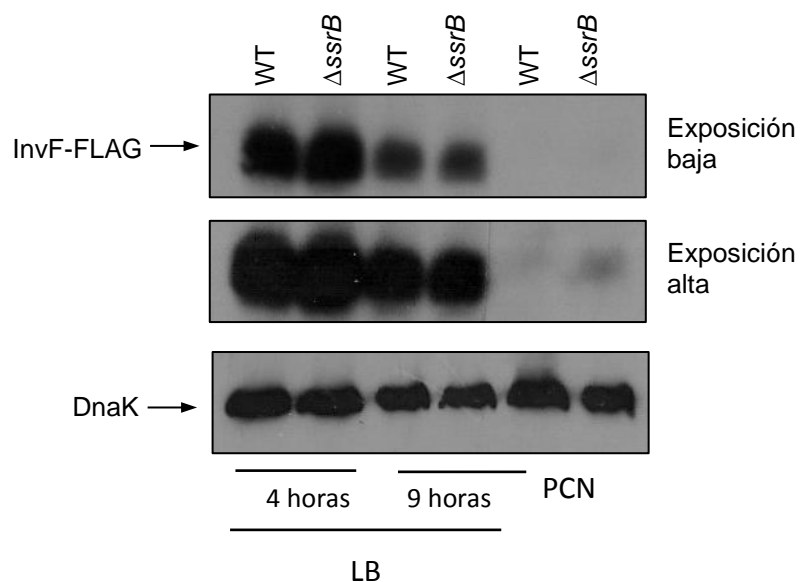


Figura 30. La expresión de InvF-FLAG se detecta a un bajo nivel en la mutante $\Delta ssrB$, pero no en la cepa WT. Se analizó por Western blot la expresión de InvF-FLAG en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y su cepa isogénica $\Delta ssrB$, usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Las muestras fueron tomadas de cultivos crecidos durante 4 horas y 9 horas en LB a 37°C y de cultivos crecidos a D.O._{600 nm} de 0.3 en medio PCN a 37°C. Como control de carga, se determinó la expresión de DnaK usando anticuerpos monoclonales anti-DnaK. La figura muestra una exposición baja y una alta de la película para la detección de InvF-FLAG.

Como experimento control, se analizó la expresión de las fusiones transcripcionales *ssaG-cat* e *invF-cat* en las mismas cepas usadas en el ensayo de Western-blot anterior. Como se esperaba, la expresión de la fusión *ssaG-cat* se indujo en la cepa WT a la hora 9 del crecimiento en el medio LB y también en el medio PCN, pero esto no ocurrió en la cepa mutante $\Delta ssrB$ (Fig. 31A). En contraste, la fusión *invF-cat* se expresó de manera similar en la cepa WT y en la mutante $\Delta ssrB$, tanto a la hora 4 como a la hora 9 del crecimiento en el medio LB, y no se detectó una expresión evidente de la fusión en estas cepas crecidas en el medio PCN (Fig. 31B). Sin embargo, cuando las cepas se crecieron en el medio PCN, un muy bajo nivel de expresión de la fusión *invF-cat* fue detectado en la mutante $\Delta ssrB$ pero no en la cepa WT (Fig. 31C). Estos resultados indican que es posible ver una des-represión de *invF* en ausencia de SsrB, cuando las cepas se

crecen en el medio PCN, pero el nivel de expresión de *invF* que se genera es muy bajo, comparado con su nivel de expresión en las cepas crecidas en LB.

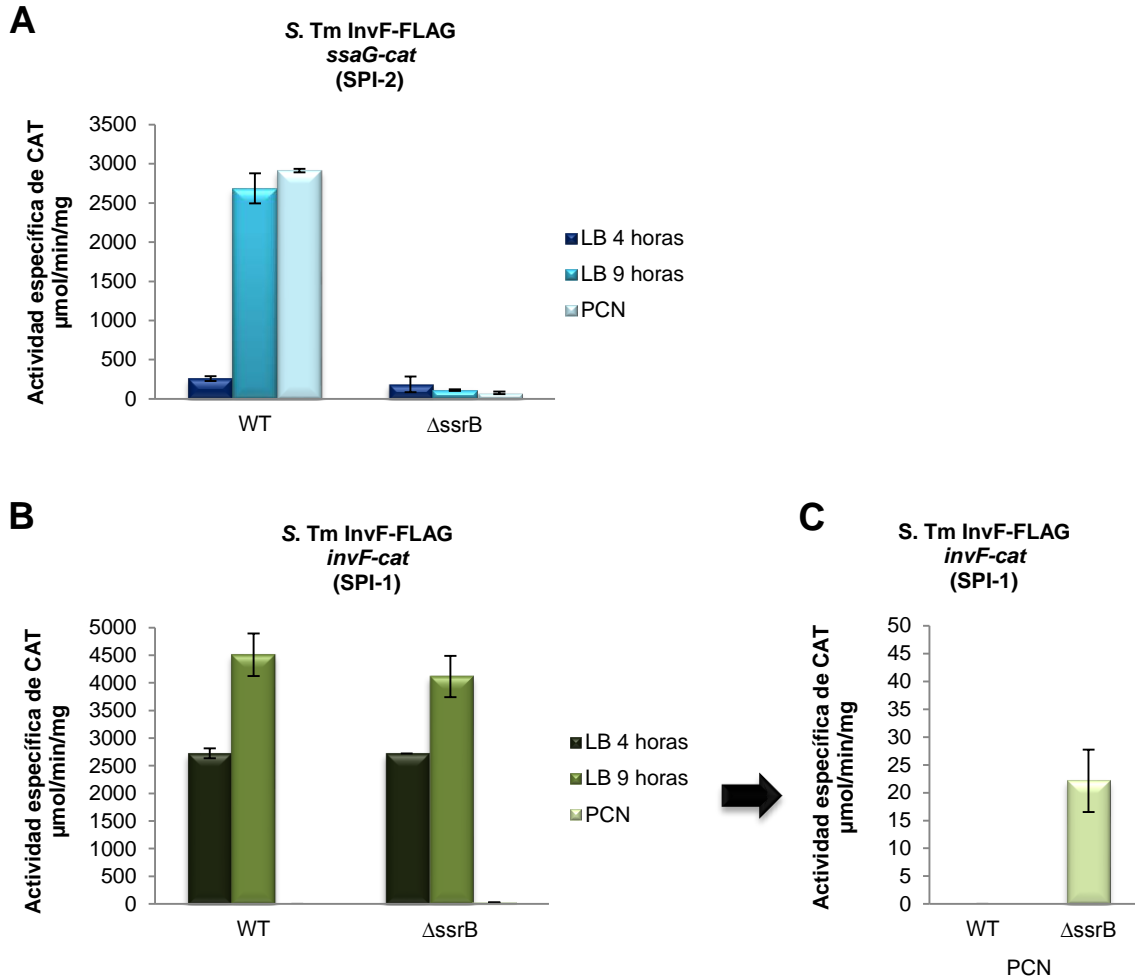
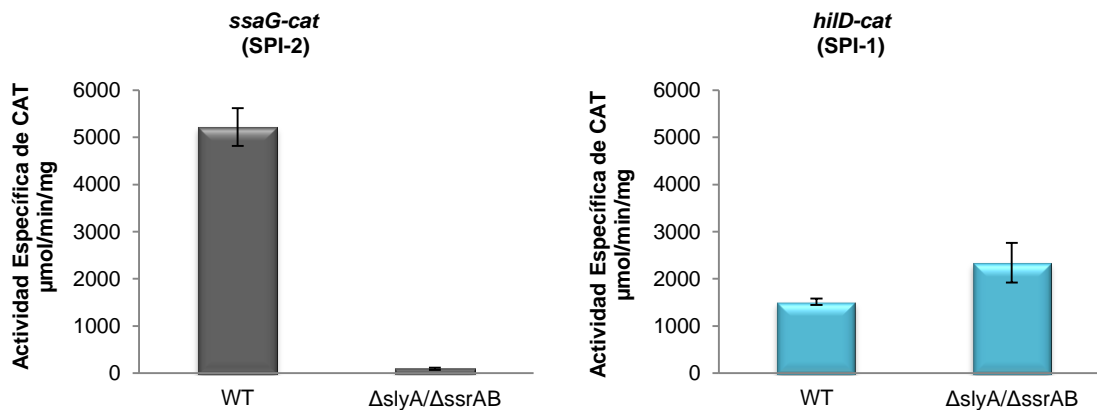


Figura 31. La expresión de la fusión *invF-cat* se detecta a un bajo nivel en la mutante Δ ssrB, pero no en la cepa WT. La expresión de las fusiones transcripcionales *ssaG-cat* (A) e *invF-cat* (B y C), contenidas en los plásmidos *pssaG-cat* y *pinvF-cat*, respectivamente, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y su cepa isogénica Δ ssrB que expresan a InvF-FLAG. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas (fase estacionaria temprana) y 9 horas (fase estacionaria tardía) en LB a 37°C o de cultivos bacterianos crecidos a D.O._{600 nm} de 0.3 en medio PCN a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

Como se mencionó anteriormente, resultados recientes obtenidos en nuestro grupo muestran que la sobre-expresión de SlyA, regulador positivo de SsrA/B, también reprime la expresión de los genes de SPI-1, al parecer de manera independiente a SsrB (Bustamante *et al.*, datos no publicados). Asimismo, los resultados de transcriptomas del grupo de Hinton muestran que la expresión de los genes de SPI-1 se des-reprimen en la mutante $\Delta slyA$, con respecto a su expresión en la cepa WT, de manera similar a lo que se obtiene con la mutante $\Delta ssrB$. Si ambos mecanismos de represión de los genes de SPI-1 son independientes entre sí, se podría esperar que la expresión de los genes de SPI-1 se des-reprima a un mayor nivel en ausencia de SsrB y SlyA. Con base en esto, se decidió construir la cepa doble mutante $\Delta slyA/\Delta ssrAB$ y evaluar la expresión de las fusiones *hilD-cat* e *invF-cat* en estas cepas crecidas en el medio PCN. Sin embargo, en esta doble mutante se observó solamente una ligera des-represión de los genes de SPI-1 (Fig. 32), similar a lo observado en la mutante $\Delta ssrB$ (Fig. 31C).



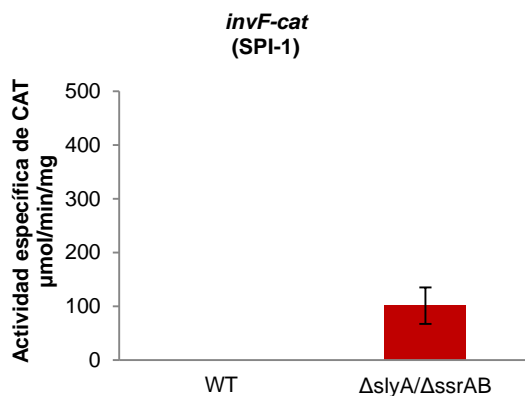


Figura 32. Los genes de SPI-1 se des-reprimen sólo parcialmente en ausencia de SlyA y SsrB en medio PCN. La expresión de las fusiones transcripcionales *ssaG-cat*, *hilD-cat* e *invF-cat*, contenidas en los plásmidos *pssaG-cat*, *philD-cat* y *pinvF-cat*, respectivamente, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* y su derivada mutante $\Delta slyA/\Delta ssrAB$. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras de cultivos bacterianos crecidos a D.O._{600 nm} de 0.3 en medio PCN con una concentración de Mg^{2+} de 10 μM a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

En conjunto, nuestros resultados indican que la sobre-expresión de SsrB reprime la expresión de los genes de SPI-1; mientras que la ausencia de SsrB solamente genera un nivel bajo de des-represión de los genes de SPI-1 cuando *Salmonella* crece en medio PCN. Asimismo, la ausencia de SsrB y SlyA no produce un efecto de des-represión franco de los genes de SPI-1 en las condiciones de crecimiento utilizadas.

6.7. SsrB reprime a *fliC* a través de su interacción directa con la región reguladora de *flhD*

La sobre-expresión de SsrB reprime la secreción de proteínas codificadas en SPI-1, pero también la secreción de la subunidad flagelar FliC (Fig. 12A). Para determinar si la sobre-expresión de SsrB reprime la transcripción de *fliC*, se analizó el efecto del plásmido pK3-SsrB sobre la expresión de una fusión transcripcional *fliC-cat*, la cual se tenía ya en nuestro laboratorio. La presencia del

plásmido pK3-SsrB reprimió drásticamente la expresión de la fusión *fliC-cat* en la cepa WT de *S. Typhimurium* y en la cepa de *S. Typhimurium* Δ *hilD*/ Δ *cthns* (Fig. 33A y D), indicando que SsrB reprime la expresión de *fliC* a nivel transcripcional y que los reguladores HilD y H-NS no participan en este mecanismo de represión.

Para determinar si SsrB reprime de manera directa a *fliC*, o lo hace indirectamente al reprimir a *flhDC* o *fliA*, que codifican para reguladores de *fliC*, primero analizamos el efecto del plásmido pK3-SsrB sobre la expresión de fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* de los genes *flhD* y *fliA*. Para esto, construimos las fusiones transcripcionales *flhD-cat* y *fliA-cat*, mediante la clonación de las regiones reguladoras de *flhD* y *fliA* en el vector pKK232-8, que contiene al gen *cat* sin promotor (ver Materiales y Métodos). La presencia del plásmido pK3-SsrB disminuyó la expresión de las fusiones *flhD-cat* y *fliA-cat* en la cepa WT de *S. Typhimurium* (Fig. 33B y C), lo cual podría sugerir que SsrB reprime directamente a *flhD* y como consecuencia, indirectamente a *fliA* y *fliC*. Para determinar esto, se analizó la interacción de SsrB con fragmentos de DNA que contienen las regiones reguladoras de *flhD*, *fliA* o *fliC*, mediante EMSAs. Como control negativo interno se utilizó un fragmento que contiene a la región reguladora de *sirA*. SsrB se unió específicamente a la región reguladora de *flhD*, pero no a las regiones reguladoras de *fliC* y *fliA* (Fig. 34).

Estos resultados demuestran que SsrB regula negativamente la expresión de *flhD*, al interaccionar directamente con su región reguladora, lo cual conlleva a la represión de *fliA* y *fliC*.

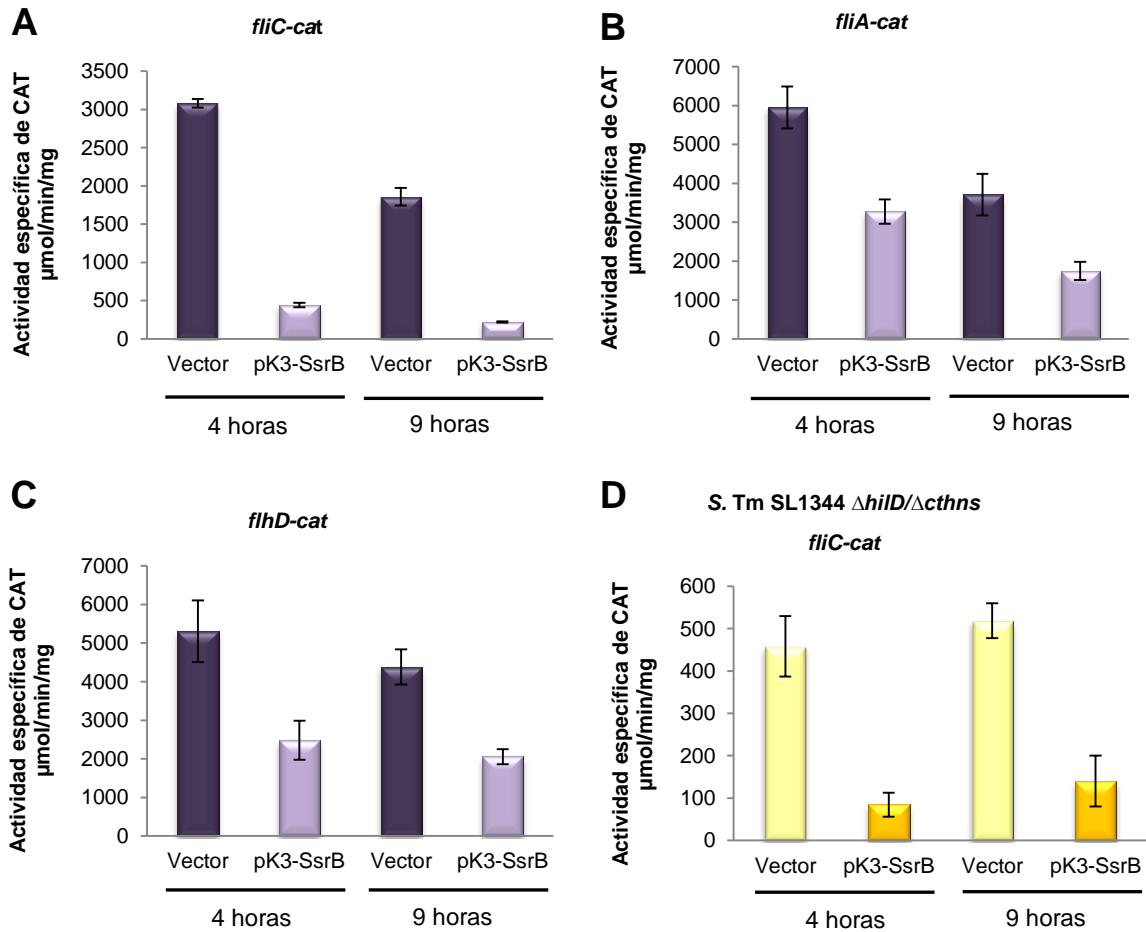


Figura 33. La sobre-expresión de SsrB reprime la expresión de *fliC*, *fliA* y *flhD*. La expresión de las fusiones transcripcionales *fliC-cat* (A), *fliA-cat* (B) y *flhD-cat* (C), contenidas en los plásmidos p*fliC-cat*, p*fliA-cat* y p*flhD-cat*, respectivamente, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* conteniendo el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-SsrB. La expresión de la fusión *fliC-cat* también se monitoreó en la cepa *S. Tm SL1344 ΔhilD/Δcths*. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 4 horas (fase estacionaria temprana) y 9 horas (fase estacionaria tardía) en LB a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

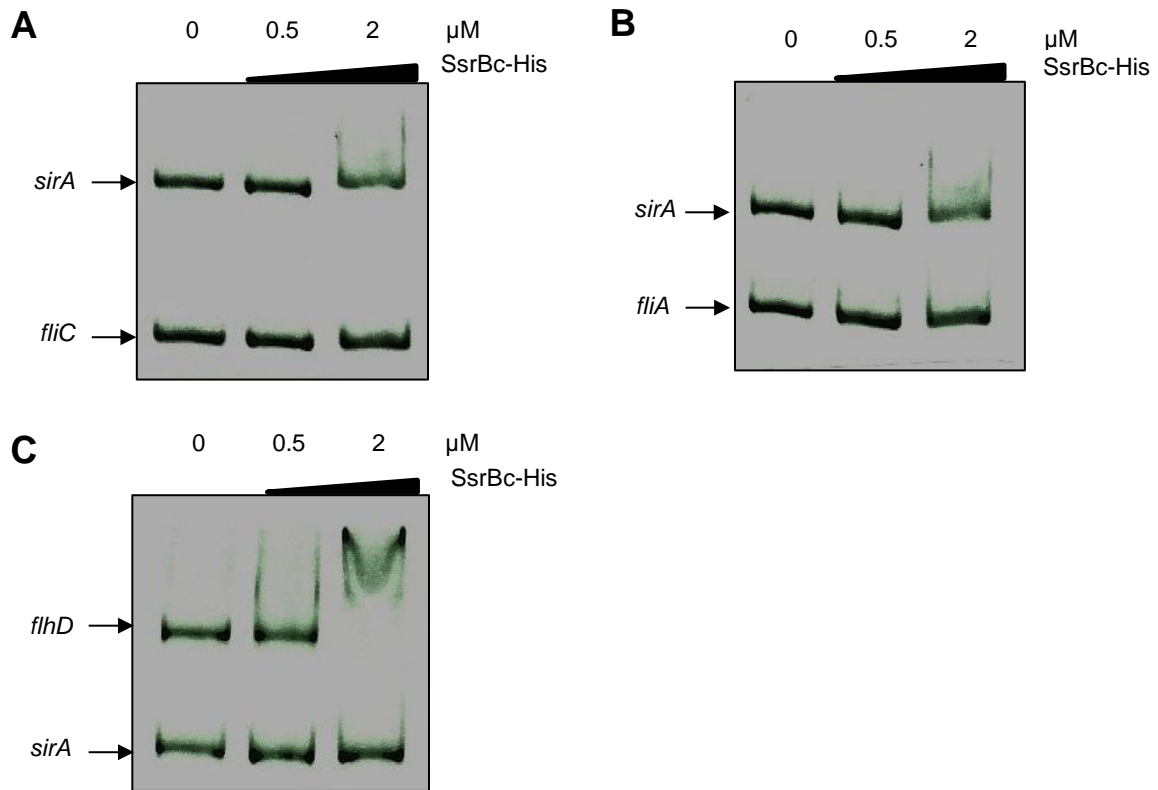


Figura 34. SsrB interactúa con la región reguladora de *flhD*, pero no con la de *fliC* y *fliA*. Los EMSAs se realizaron usando fragmentos que contienen las regiones reguladoras de *sirA*, *fliC*, *fliA* y *flhD*, y concentraciones crecientes de la proteína purificada SsrBc-His (0, 0.5 y 2 μM). Los complejos DNA-proteína fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con bromuro de etidio. El fragmento de *sirA* fue utilizado como control negativo.

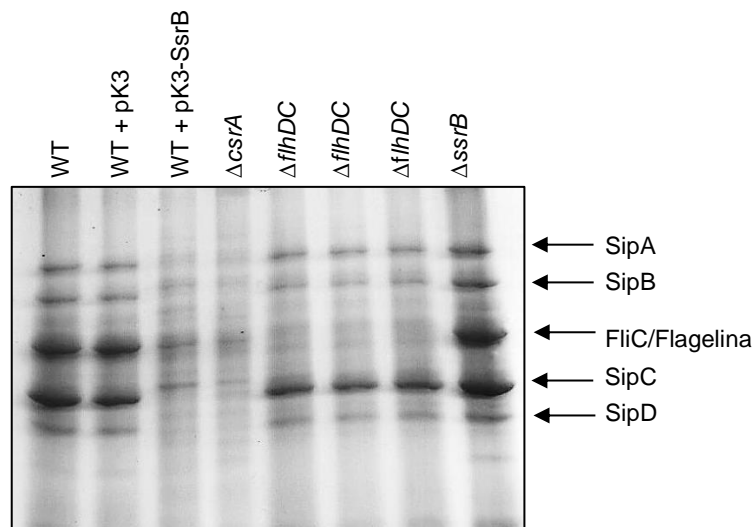
6.8. La represión de los genes flagelares mediada por SsrB no afecta la movilidad de *Salmonella*

Nuestros resultados muestran que tanto la expresión de *fliC* (Fig. 33A y D) como la secreción de FliC (Fig. 12A) se reprime cuando SsrB se sobre-expresa. Entonces, para probar si la represión que ejerce SsrB sobre la expresión de *fliC* puede ser suficiente para afectar la movilidad de *Salmonella*, se realizaron ensayos de movilidad en agar LB suave. Para esto se construyó la cepa mutante $\Delta flhDC$, que se utilizó como control negativo (ver Materiales y Métodos), ya que el complejo FlhDC regula positivamente a *fliC*. Asimismo, se usó también como

control negativo en estos ensayos a la mutante $\Delta csrA$, ya que CsrA regula positivamente a los genes del flagelo (Wei *et al.*, 2001; Lawhon *et al.*, 2003; Jonas *et al.*, 2010). Las cepas que se utilizaron en los ensayos de movilidad mostraron el perfil esperado de proteínas secretadas; en las mutantes $\Delta flhDC$ y $\Delta csrA$ se observa una represión en la secreción de FliC en comparación con la cepa WT de *S. Typhimurium*; igualmente se observa que en presencia del vector pMPM-K3 no se afecta el perfil de secreción, mientras que el plásmido pK3-SsrB reprime la secreción de las proteína codificadas en SPI-1 y de FliC. En la mutante $\Delta ssrB$ se observa un perfil de secreción similar al de la cepa WT (Fig. 35A).

En cajas de LB con un bajo contenido de agar (0.3%) la movilidad de *S. Typhimurium* se observa como halos de difusión radial alrededor del inóculo inicial, mientras que las cepas no móviles únicamente crecen en el punto de inoculación. La presencia del plásmido pK3-SsrB no afectó la movilidad de *Salmonella*, con respecto al fenotipo mostrado por la cepa WT conteniendo o no el vector pMPM-K3 (Fig. 35B). De igual manera, la movilidad de la mutante $\Delta ssrB$ no se afecta, con respecto a la movilidad de la cepa WT (Fig. 35C). En contraste, las cepas mutantes $\Delta flhDC$ y $\Delta csrA$ no mostraron movilidad (Fig. 35B y C).

A



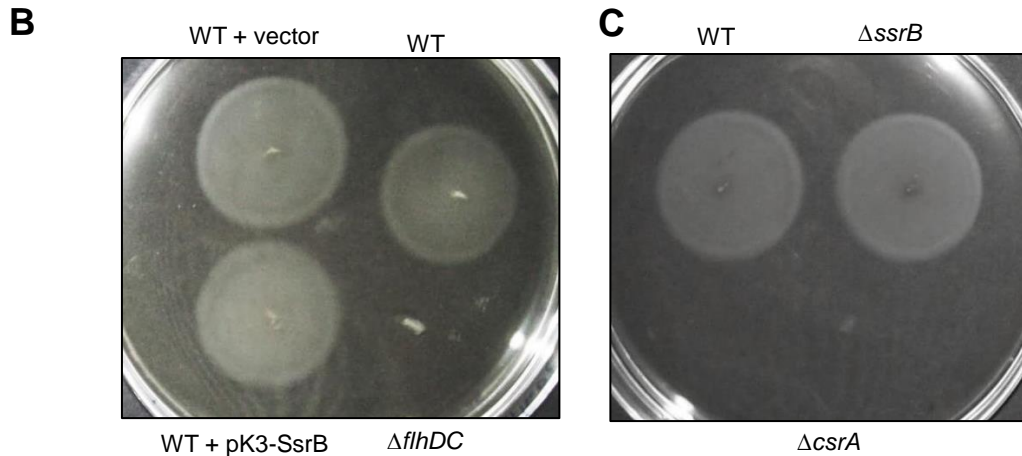


Figura 35. La sobre-expresión o la ausencia de SsrB no afecta la movilidad de *S. Typhimurium*. (A) Perfil de proteínas secretadas de la cepa *S. Typhimurium* SL1344 WT, conteniendo o no el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-SsrB, y sus derivadas mutantes $\Delta csrA$, $\Delta flhDC$ y $\Delta ssrB$. Las proteínas SipA, SipB, SipC y SipD se codifican en SPI-1 y se secretan por el SST3 codificado en esta isla. La proteína FliC es una de las subunidades del flagelo. Las cepas bacterianas se crecieron en LB a 37°C durante 8 horas. (B) Comparación de la movilidad entre la cepa *S. Typhimurium* SL1344 WT, conteniendo o no el vector pMPM-K3 o plásmido pK3-SsrB, y sus derivadas mutantes $\Delta flhDC$, $\Delta csrA$ y $\Delta ssrB$. Las cepas se inocularon picando el agar LB al 0.3% de las cajas y se incubaron a 37°C durante 7 horas.

En los perfiles de proteínas secretadas se puede observar que la presencia del plásmido pK3-SsrB no reprime por completo la secreción de FliC, comparada con lo que se observa para las mutantes $\Delta flhDC$ y $\Delta csrA$ (Fig. 35A). En apoyo a esto, la expresión de la fusión *fliC-cat*, aunque disminuye tanto en la cepa WT conteniendo al plásmido pK3-SsrB como en la mutante $\Delta csrA$, su expresión fue ligeramente mayor en la cepa WT con el plásmido pK3-SsrB que en la mutante $\Delta csrA$ (Fig. 36).

En conjunto, los resultados anteriores muestran que el fenotipo de movilidad de *S. Typhimurium* se puede mantener con una baja expresión de FliC.

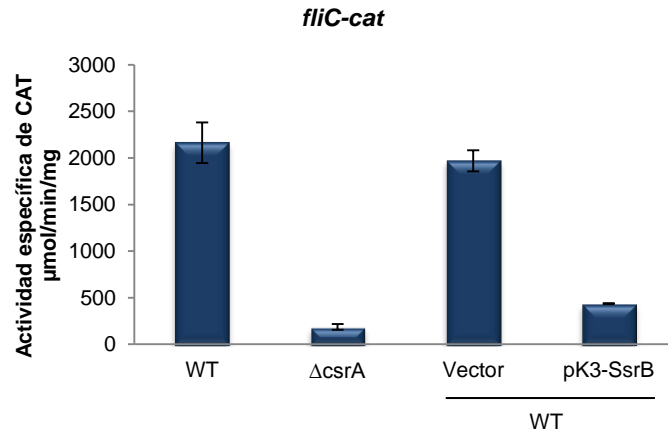


Figura 36. El nivel de expresión de *fliC* es menor en ausencia de *CsrA* que cuando se sobre-expresa *SsrB*. La expresión de la fusión transcripcional *fliC-cat*, contenida en el plásmido p*fliC-cat*, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* y su derivada mutante $\Delta csrA$, así como en la cepa WT conteniendo el vector pMPPM-K3 o el plásmido pK3-SsrB, que expresa de manera constitutiva a *SsrB*. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante toda la noche en LB a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar.

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El estudio de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 es muy importante para conocer a profundidad el mecanismo de patogénesis de *Salmonella*. En estudios previos realizados en nuestro grupo se han hecho contribuciones importantes para esclarecer los mecanismos de regulación de los genes de SPI-1 y SPI-2 (Bustamante *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que SsrB reprime a la cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 a tres diferentes niveles, reprimiendo directamente la expresión de los genes *csrB*, *hilD* y *hilA*.

Los sRNAs CsrB (366 nt) y CsrC (245 nt) regulan indirectamente la expresión de los genes de SPI-1, al unirse y atrapar a la proteína CsrA, la cual regula negativamente a nivel traduccional la expresión de *hilD* (Martínez *et al.*, 2011). CsrB contiene 18 sitios de unión a CsrA, mientras que CsrC contiene únicamente 9 sitios (Liu *et al.*, 1997; Weilbacher *et al.*, 2003), por lo que CsrB tiene mayor capacidad de titular a CsrA. Los resultados de este trabajo demuestran que SsrB reprime directamente la expresión de *csrB*, al unirse a su región reguladora, sin embargo esta represión de *csrB* mediada por SsrB no tiene un efecto importante en la expresión de los genes de SPI-1 cuando *Salmonella* crece en el medio LB a 37°C. Esto puede deberse al papel redundante que tienen CsrB y CsrC en la regulación de los genes de SPI-1 en estas condiciones de crecimiento (Martínez *et al.*, 2011), y al hecho de que SsrB no reprime a *csrC*, como lo muestran nuestros resultados. Sin embargo, la represión de *csrB* por SsrB podría ser importante para la regulación de los genes de SPI-1 en algún nicho de los hospedantes de *Salmonella* durante una infección, donde se expresara *csrB* pero no *csrC*. Asimismo, aún en las condiciones donde se induce la expresión tanto de CsrB como de CsrC, el hecho de que CsrB tenga un mayor número de sitios de unión para CsrA que CsrC, hace posible que la represión de la expresión de *csrB* pueda afectar algunos, pero no a todos los blancos de CsrA. Por lo tanto, la

represión de *csrB* mediada por SsrB podría regular la expresión de otros genes blanco de CsrA, como aquellos involucrados en el metabolismo de carbono o la movilidad (Liu *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2001).

Nuestros resultados indican que SsrB se une a la región que comprende las posiciones -114 a -50 de la región reguladora de *csrB*. En esta misma región se localiza el sitio de unión del regulador IHF, el cual controla positivamente la expresión de *csrB*, probablemente al inducir un doblamiento en el DNA que favorece la formación del complejo SirA-RNAPol-promotor, activándose así la transcripción de *csrB* (Martínez *et al.*, 2014). Con base en esto, proponemos que es posible que SsrB reprima la expresión de *csrB* al evitar la unión o función de IHF sobre este gen.

SsrB también reprime directamente la expresión de *hilD* y *hilA*. Esta represión de *hilD* y *hilA* por SsrB podría ser necesaria para regular diferencialmente la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2. Al actuar sobre *hilD*, SsrB reprimiría la expresión tanto de los genes de SPI-1 como la de los genes de SPI-2, lo cual podría ser un paso precedente para que los genes de SPI-2 quedaran bajo la regulación de otros reguladores, como sucede cuando *Salmonella* crece en medios mínimos y cuando esta bacteria se encuentra dentro de las células de su hospedador. Por otro lado, SsrB podría reprimir específicamente a los genes de SPI-1 actuando sobre *hilA*, para permitir solamente la expresión de los genes de SPI-2 mediada por HilD, lo cual podría ser importante para una primera transición de la expresión de los genes de SPI-1 a la expresión de los genes de SPI-2, como sucede cuando *Salmonella* crece en el medio LB en una fase estacionaria tardía, y probablemente cuando *Salmonella* se encuentre en el intestino. La concentración que pueda alcanzar SsrB en diferentes condiciones de crecimiento podría determinar su acción diferencial sobre sus blancos.

Con los resultados previos de nuestro grupo (Bustamante *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2011) y los resultados de este trabajo se establece una comunicación bi-direccional a nivel de transcripción entre SPI-1 y SPI-2. En la que,

primero HilD, codificado en SPI-1, induce la expresión consecutiva de los genes de SPI-1 y SPI-2, cuando *Salmonella* crece en LB y probablemente cuando se encuentra en el lumen intestinal, y posteriormente, SsrB, codificado en SPI-2, induciría la expresión de los genes de SPI-2 y reprimiría a los genes de SPI-1, cuando *Salmonella* crece en medio mínimo o cuando se encuentra dentro de las células de su hospedador.

Nuestros resultados sugieren que SsrB actúa directamente sobre el promotor de *hilD*. Así, SsrB probablemente reprime la expresión de *hilD* uniéndose a esta secuencia e impidiendo la unión de la RNA polimerasa al promotor (Fig. 37)

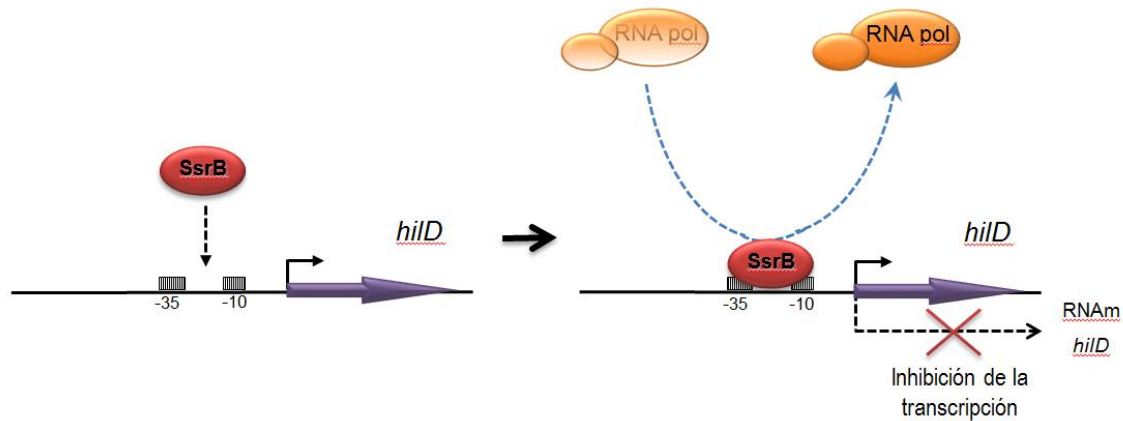


Figura 37. Modelo propuesto para la regulación de *hilD* por SsrB. SsrB reconoce una secuencia localizada en el promotor de *hilD*, lo que probablemente impide la unión de la RNA polimerasa al promotor, inhibiéndose así la transcripción de *hilD*.

En un análisis de la secuencia que contiene este promotor se localizó un posible sitio de unión de SsrB, entre las regiones -35 y -10, con base a una secuencia consenso de unión de SsrB que se reportó previamente (Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010). Sin embargo, la mutación de cuatro bases de este probable sitio de unión (en las posiciones -21, -22, -23 y -25), no afectó la represión de *hilD* mediada por SsrB ni la interacción de SsrB con el promotor de este gen. Aunque estas mutaciones disminuyeron la expresión del promotor de *hilD*, sugiriendo que la secuencia mutada es importante para el reconocimiento adecuado de este

promotor por la RNA polimerasa. Con un análisis más minucioso se localizó otro probable sitio de unión de SsrB en el promotor de *hilD*, localizado sobre la región -10, que también tiene similitud a la secuencia consenso de unión reportada para SsrB. Se decidió entonces mutar la base (G por A) que mejor se conserva en el consenso de unión de SsrB, en los dos probables sitios de unión de SsrB en *hilD* (-9 y -23). La mutación en la posición -9 (G por A) mejoró el consenso de la región -10 (TAGGAT a TAGAAT), lo cual hizo que el nivel de expresión de este promotor fuera mayor. Sin embargo, SsrB aún fue capaz de reprimir y unirse al promotor de *hilD* con estas mutaciones. Estos resultados indican que SsrB reconoce en *hilD* una secuencia que es diferente a la secuencia de unión de SsrB reportada anteriormente. Con relación a esto, existen otros reportes que indican que SsrB se une a sitios degenerados, lo cual ha dificultado obtener una secuencia consenso de unión precisa para este regulador (Feng *et al.*, 2004; Walthers *et al.*, 2007; Walthers *et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha demostrado que SsrB se une a sitios localizados en diferentes posiciones con respecto al sitio del inicio de la transcripción de los genes que regula positivamente. Estos sitios pueden estar proximales al promotor, o superponerse al hexámero -35 o al -10 o incluso al sitio de inicio de la transcripción (Feng *et al.*, 2004; Walthers *et al.*, 2007; Walthers *et al.*, 2011). Esta diversidad de regulación de promotores por SsrB sugiere que no existe un mecanismo común para el control de la transcripción mediado por SsrB. En diferentes estudios se ha demostrado que SsrB puede utilizar dos mecanismos para regular la transcripción, actuando como antirepresor, contrarrestando el silenciamiento mediado por el represor H-NS (Walthers *et al.*, 2007; Walthers *et al.*, 2011), o como activador directo de la transcripción (Walthers *et al.*, 2011). A la fecha no hay reportes previos de que SsrB actúe como represor. No obstante, existen reportes de que otros reguladores de respuesta que forman parte de la subfamilia NarL/FixJ, a la que pertenece SsrB (Feng *et al.*, 2004), tienen función tanto de activador como de represor. Por ejemplo, el regulador de respuesta NarL puede actuar como un activador de la transcripción de la nitrato y nitrito reductasa,

o como represor de la transcripción de la fumarato reductasa (Rabin and Stewart, 1993; Darwin and Stewart, 1996; Xiao *et al.*, 2002).

Así, nuestro trabajo demuestra por primera vez que SsrB, además de su papel de regulador positivo, también actúa como represor de la expresión génica. Más aún, nuestro trabajo indica que SsrB puede seguir diferentes mecanismos para actuar como represor; por ejemplo, para el caso de *hilD* reprime directamente al promotor y en *csrB*, al parecer, evita la acción de un regulador positivo.

Nosotros encontramos que SsrB también reprime la expresión del gen *fliC*, que codifica para una de las subunidades mayoritarias del flagelo, la flagelina. El flagelo es otro de los sistemas, además de los SST3-1 y SST3-2, que se ha demostrado que es importante para el mecanismo de patogénesis de *Salmonella* (Schmitt *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2007). En este trabajo demostramos que SsrB reprime directamente al operón *flhDC*, el cual codifica para el complejo FlhDC que regula positivamente la expresión del factor sigma flagelar que a su vez induce la expresión de *fliC* (Takaya *et al.*, 2012). En apoyo a estos resultados, se ha reportado que la expresión de *fliC* y la de los demás genes flagelares se reprime, al igual que la expresión de los genes de SPI-1, cuando *Salmonella* se encuentra dentro de macrófagos, donde se induce la expresión de SsrB (Eriksson *et al.*, 2003).

El filamento del flagelo es una estructura cilíndrica helicoidal, la cual crece hasta una longitud de aproximadamente 15 μm por medio del ensamblaje de alrededor de 30,000 subunidades de flagelina (FliC) (Auvray *et al.*, 2001; Beatson *et al.*, 2006). El filamento funciona como el elemento propulsor en el flagelo al rotar como una hélice cuando la torsión mecánica es transmitida desde el motor alojado en el cuerpo basal (Berg, 2000). Por lo cual, la movilidad de las bacterias flageladas deriva de la rotación del filamento del flagelo (Macnab, 1999), donde la adecuada expresión de los componentes del mismo es determinante para el ensamblaje y funcionalidad de estas estructuras (Macnab, 2003). Tomando en cuenta esto, se decidió evaluar si el efecto represor de SsrB sobre la expresión de

fliC afectaba el fenotipo de movilidad de *Salmonella*. Sin embargo, la movilidad de *Salmonella* no se vio afectada por la sobre-expresión de SsrB en las condiciones probadas. En contraste, en ausencia de FlhDC o CsrA, reguladores positivos de los genes flagelares (Chilcott and Hughes, 2000; Wei *et al.*, 2001; Lawhon *et al.*, 2003), *Salmonella* no presentó movilidad. Nuestros resultados muestran que la expresión de *fliC* se disminuye con la sobre-expresión de SsrB y con la ausencia de CsrA; sin embargo, dicha disminución es mayor en ausencia de CsrA que con la sobre-expresión de SsrB. Así, el bajo nivel de expresión de FliC que se mantiene con la sobre-expresión de SsrB puede ser suficiente para que se ensamblen los flagelos requeridos, entre 5 y 10 flagelos (Kutsukake and Iino, 1994), para que *S. Typhimurium* pueda moverse bien en las condiciones probadas, lo cual explicaría el porqué no observamos un efecto en la movilidad con la sobre-expresión de SsrB.

Además de su papel en movilidad, la flagelina, que forma el filamento del flagelo, es considerada un PAMP, por lo que activa la expresión de citosinas pro-inflamatorias, como la IL-8 (Gewirtz *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2001; Miao *et al.*, 2007). Entonces, la represión de los genes flagelares mediada por SsrB podría ser importante para que *Salmonella* evada la respuesta inmune innata del hospedero provocada por la flagelina.

Se ha reportado que algunos reguladores coordinan la expresión de los genes de SPI-1, SPI-2 y flagelares. RtsA y RtsB han sido involucrados en la transición de la expresión de los genes del flagelo a la de los genes de SPI-1. RtsA es importante para la expresión de los genes de SPI-1, mientras que RtsB reprime la expresión de los genes flagelares, coordinando así la inducción de la invasión y la represión de la movilidad en el intestino delgado (Ellermeier and Slauch, 2003). Por otra parte, el sistema de dos componentes PhoP/Q, el cual regula positivamente a los genes de SPI-2 (Deiwick *et al.*, 1999; Fass and Groisman, 2009), reprime la expresión de los genes flagelares (Adams *et al.*, 2001). Los resultados de este trabajo indican que el sistema SsrA/B también está

involucrado en el control coordinado de la expresión de los genes de SPI-1, SPI-2 y flagelares.

Nuestros resultados muestran claramente que la sobre-expresión de SsrB reprime a los genes de SPI-1, a *csrB* y a los genes que codifican para el flagelo. Con base en esto, se podría esperar que en ausencia de SsrB se incrementara la expresión de estos genes, sobre todo en una condición en la que normalmente no se expresan, como sería en un medio mínimo, en donde además se favorece la expresión de SsrB. En el grupo del Dr. Hinton (University of Liverpool, United Kingdom) se obtuvieron, mediante secuenciación masiva de RNA (RNA-seq), transcriptomas de la cepa WT de *S. Typhimurium* y su derivada mutante Δ *ssrB*, crecidas en el medio mínimo PCN. El análisis de estos transcriptomas muestra que en ausencia de SsrB hay una evidente des-represión de los genes de SPI-1, *csrB* y los genes flagelares (Hinton *et al.*, datos no publicados). Este mismo fenómeno lo observamos al analizar la expresión de *invF*, pero no para el caso de *hilA* y *hilD*. En el caso de *invF* se detectó la des-represión al analizar su expresión usando una fusión transcripcional o por experimentos de Western blot, en las cepas WT de *S. Typhimurium* y en su derivada mutante Δ *ssrB*, crecidas en el medio PCN. Sin embargo, el nivel de expresión que alcanzó *invF* en ausencia de SsrB, en esta condición de crecimiento, es 100 veces menor a su nivel de expresión que muestran cuando *Salmonella* crece en el medio LB. Nosotros creemos que lo que muestra el análisis de los transcriptomas es algo similar a lo que nosotros observamos en nuestros experimentos; la ausencia de SsrB genera un nivel bajo de des-represión de los genes que estamos estudiando. Esto con base a que en el análisis de los transcriptomas se toma como referencia la expresión que se obtiene de estos genes en la cepa WT, la cual es muy baja en el medio PCN.

De manera interesante, resultados recientes obtenidos en nuestro grupo y en el grupo de Hinton indican que SlyA, regulador positivo de SsrA/B, también reprime la expresión de los genes de SPI-1, al parecer de manera independiente a SsrB. Sin embargo, nosotros determinamos que aún en ausencia de SsrB y SlyA

los genes de SPI-1 se des-reprimen sólo ligeramente cuando *Salmonella* crece en el medio PCN. Resultados obtenidos en nuestro grupo y en otros grupos muestran que la expresión de los genes de SPI-1 también se reprime por otros reguladores, como CpxR, RpoH, HilE y Lon (Fàbregas and Vila, 2013; Bustamante *et al.*, datos no publicados). En conjunto, estos resultados sugieren que la expresión de los genes de SPI-1 es regulada negativamente por múltiples mecanismos que actúan de manera independiente (Fig. 38). Es posible que cuando *Salmonella* crece en el medio mínimo, la represión de los genes de SPI-1, de *csrB* y de los genes flagelares, esté mediada por SsrB y por otras de las vías adicionales de represión de estos genes. Sin embargo, es posible que en un nicho específico que encuentre *Salmonella* dentro de sus hospedadores, la represión de los genes de SPI-1 se lleve a cabo exclusivamente a través de SsrB. La importancia biológica de que SsrB reprima a los genes de SPI-1, y a su vez induzca la expresión de los genes de SPI-2, puede ser el evitar que se expresen al mismo tiempo los SST3 que se codifican en ambas islas, lo cual podría afectar el ensamblaje apropiado de éstos.

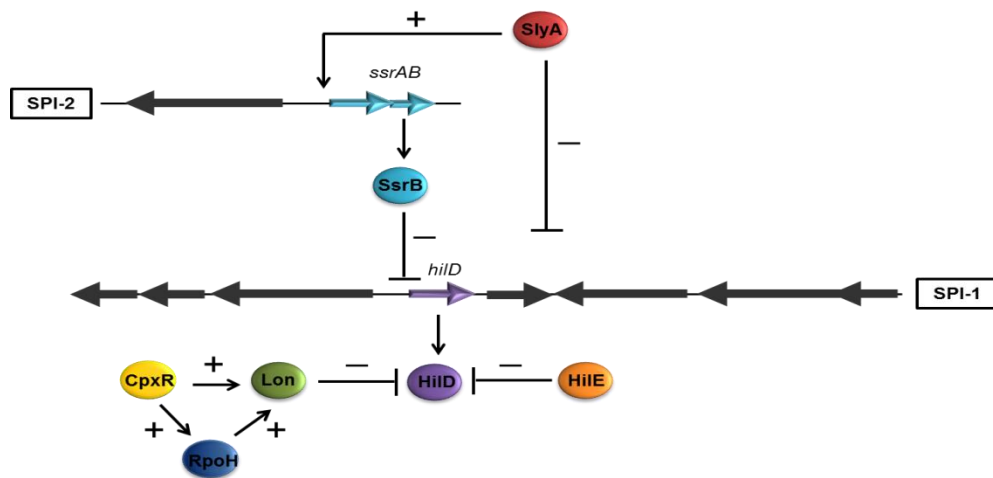


Figura 38. La expresión de los genes de SPI-1 es regulada por múltiples vías de represión. El regulador de respuesta SsrB, codificado dentro de SPI-2 regula negativamente la expresión de SPI-1 al reprimir directamente la expresión de *hilD*. Sin embargo, existen otros mecanismos de represión de los genes de SPI-1, las cuales actúan de manera independiente. En uno de estos mecanismos participa SlyA, regulador positivo del operón *ssrAB*. Otro mecanismo de represión involucra al regulador CpxR, al factor sigma RpoH y la proteasa Lon. Asimismo, HilE reprime a los genes de SPI-1 al inactivar a HilD.

En resumen, nuestros resultados indican que SsrB actúa como un regulador global que controla, no sólo positivamente, pero también negativamente, la expresión de genes adquiridos durante la evolución de la patogenicidad de *Salmonella*, como los genes de SPI-1 y SPI-2, y también de genes pre-existentes a la propia adquisición de SsrB, como los genes *csrB* y flagelares. Asimismo, nuestros resultados añaden una vía más a la cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, la cual consiste en la represión directa que ejerce SsrB sobre *hilD* y *hilA*, y conectan a esta cascada de regulación con aquella que controla la expresión de los genes flagelares, vía la represión que ejerce SsrB sobre *flhDC* (Fig. 39).

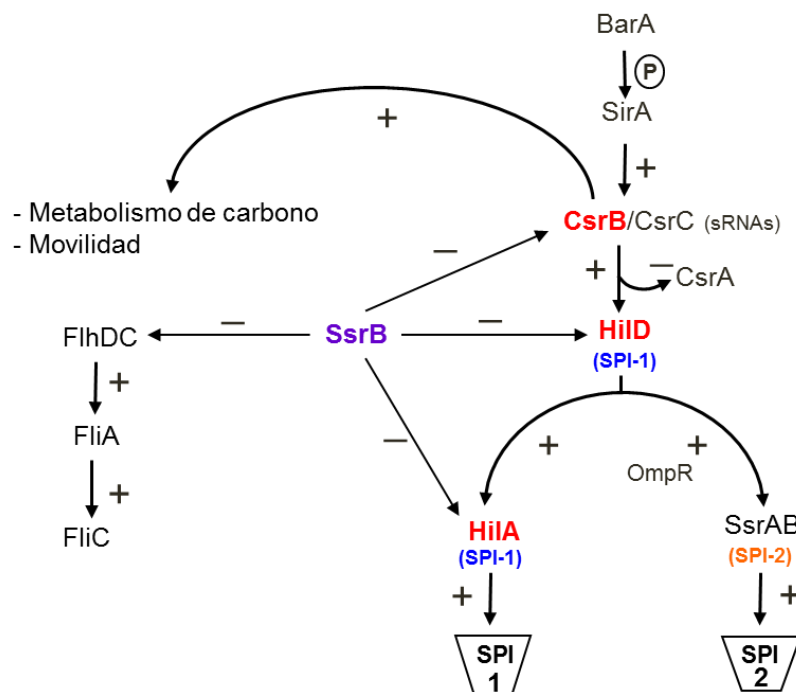


Figura 39. Esquema del modelo de regulación en cascada de los genes de SPI-1, SPI-2 y del flagelo, donde participa el sistema de dos componentes SsrA/B. Ver el texto para la descripción.

El conocimiento que se generó en este trabajo contribuirá al mejor entendimiento de los mecanismos que le permiten a *Salmonella* regular la expresión genética en sus diferentes nichos biológicos.

8. PERSPECTIVAS

Para elucidar con más detalle el mecanismo molecular por medio del cual SsrB actúa como represor de los genes de SPI-1, *csrB* y los genes flagelares, así como para determinar la importancia en la virulencia de *Salmonella* que tienen estos mecanismos de represión mediados por SsrB, proponemos los siguientes objetivos:

- Determinar la secuencia de unión de SsrB en *hilD*, *hilA*, *csrB* y *flhDC*, mediante experimentos de “footprinting”, de mutagénesis sitio-dirigida, de EMSAs, de análisis de expresión genética y de bioinformática (análisis de perfiles filogenéticos *in silico*).
- Determinar si SsrB evita la unión de IHF sobre la región reguladora de *csrB*, mediante EMSAs competitivos.
- Determinar si el número de flagelos disminuye al sobre-expresarse SsrB, por medio de microscopía electrónica.
- Generar cepas mutantes de *S. Typhimurium* en las que se inactive la ruta de represión mediada por SsrB, en los genes de SPI-1, *csrB* y de los genes flagelares, y determinar el grado de virulencia de estas cepas mutantes en diferentes modelos, animales y de cultivos de células, que se usan para estudiar la virulencia de *Salmonella*.

9. APÉNDICE

9.1. Medios de cultivo empleados

Medio rico en nutrientes Luria-Bertani (LB)

Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	10 g

Se afora a 1 L con agua desionizada y se ajusta el pH a 7.5. Posteriormente es esterilizado 20 min a 121°C a 15 libras de presión. Para LB sólido se agregan 15 g de agar por litro.

Medio mínimo N (MM-N)

KCl	5 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	7.5 mM
K ₂ SO ₄	0.5 mM
KH ₂ PO ₄	1 mM
Tris HCl pH 7.5	100 mM
MgCl ₂	10 μM
Glicerol	0.5% v/v
Casaminoácidos	0.1%

Posteriormente es esterilizado 20 min a 121°C a 15 libras de presión.

Medio PCN

80mM	MES (pH 5.8)
4 mM	Tricina
100 μM	FeCl ₃
376 μM	K ₂ SO ₄
50 mM	NaCl
0.4 mM	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH 5.8
0.4 %	Glucosa (22.2 mM)
15 mM	NH ₄ Cl
1 mM	MgSO ₄
0.01 mM	CaCl ₂

Solución de micronutrientes:

10 nM Na₂MoO₄

10 nM Na₂SeO₃

4 nM H₃BO₃

300 nM CoCl₂

100 nM CuSO₄

800 nM MnCl₂

1 nM ZnSO₄

Se afora a 1 L con agua desionizada y se esteriliza por filtración.

Medio SOC

Bacto-triptona	2 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl 5M	200 µl
KCl 1M	250 µl
MgCl ₂ 1M	1 ml
MgSO ₄ 1M	1 ml
Glucosa	0.36 g

Se afora a 100 ml con agua desionizada y se esteriliza durante 20 mn a 121°C a 15 libras de presión.

Medio SOB

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	2.5 g
NaCl	.25 g
KCl 1M	1.25 ml
Glucosa	0.36 g

Se afora a 500 ml con agua desionizada y se esteriliza durante 20 mn a 121°C a 15 libras de presión.

Medio Lennox

Extracto de levadura	5 g
----------------------	-----

Triptona	10 g
NaCl	5 g

Se afora a 1 L con agua desionizada. Posteriormente es esterilizado 20 min a 121°C a 15 libras de presión.

9.2. Reactivos utilizados para Western blot

Buffer de transferencia

Tris	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0.04% v/v
Metanol	20% v/v

PBS 10X

Na ₂ HPO ₄	6.1 g
K ₂ HPO ₄	2 g
KCl	2 g
NaCl	80 g

Se afora a 1 L con agua desionizada y se ajusta el pH a 6.8. Posteriormente es esterilizado 20 min a 121°C a 15 libras de presión.

PBST

PBS 10X	100 ml
Tween-20	3 ml

Solución bloqueadora

Leche en polvo sin grasa	1.5 g
PBST	30 ml

10. REFERENCIAS

1. **Adams, P., Fowler, R., Kinsella, N., Howell, G., Farris, M., Coote, P., and O'Connor, C. D.** (2001) Proteomic detection of PhoPQ- and acid-mediated repression of *Salmonella* motility. *Proteomics* 1: 597-607.
2. **Aizawa, S.I.** (1996) Flagellar assembly in *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol* 19: 1-5.
3. **Aldridge, P., and Hughes, K. T.** (2002) Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* 5: 160-165.
4. **Altier, C.** (2005) Genetic and Environmental Control of *Salmonella* Invasion. *J Microbiol* 43: 85-92.
5. **Auvray, F., Thomas, J., Fraser, G. M., and Hughes, C.** (2001) Flagellin polymerisation control by a cytosolic export chaperone. *J Mol Biol* 308: 221-229.
6. **Baikalov, I., Schroder, I., Kaczor-Grzeskowiak, M., Grzeskowiak, K., Gunsalus, R. P., and Dickerson, R. E.** (1996) Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry* 35: 11053-11061.
7. **Bajaj, V., Lucas, R. L., Hwang, C., and Lee, C. A.** (1996) Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol* 22: 703-714.
8. **Bakowski, M. A., Braun, V., and Brumell, J. H.** (2008) *Salmonella*-Containing Vacuoles: Directing Traffic and Nesting to Grow. *Traffic* 9: 2022-2031.
9. **Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., and Heffron, F.** (1996) Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 64: 1862-1865.
10. **Beatson, S. A., Minamino, T., and Pallen, M. J.** (2006) Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *TIM* 14: 151-155.
11. **Beier, D., and Gross, R.** (2006) Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* 9: 143-152.
12. **Berg, H. C.** (2000) Constraints on models for the flagellar rotary motor. *Philos Trans R Soc London [Biol]* 355: 491-501.
13. **Beuzón, C. R., Méresse, S., Unsworth, K. E., Ruíz-Albert, J., Garvis, S., Waterman, S. R., Ryder, T. A., Boucrot, E., and Holden, D. W.** (2000) *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *EMBO J* 19: 3235-3249.
14. **Bijlsma, J. J., and Groisman, E. A.** (2005) The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 57: 85-96.

-
15. **Bhan, M. K., Bahl, R., and Bhatnagar, S.** (2005) Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet* 366: 749-62.
 16. **Boucrot, E., Henry, T., Borg, J. P., Gorvel, J. P., and Méresse, S.** (2005) The intracellular fate of *Salmonella* depends on the recruitment of kinesin. *Science* 308: 1174-1178.
 17. **Boyle, E. C., Brown, N. F., and Finlay, B. B.** (2006) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium effectors SopB, SopE, SopE2 and SipA disrupt tight junction structure and function. *Cell Microbiol* 8: 1946-1957.
 18. **Brawn, L. C., Hayward, R. D., and Koronakis, V.** (2007) *Salmonella* SPI1 Effector SipA Persists after Entry and Cooperates with a SPI2 Effector to Regulate Phagosome Maturation and Intracellular Replication. *Cell Host Microbe* 1: 63-75.
 19. **Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., and Swaminathan, B.** (2000) *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol* 38: 2465-2467.
 20. **Brown, N. F., Vallance, B. A., Combes, B. K., Valdez, Y., Coburn, B. A., and Finlay, B. B.** (2005) *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS Pathog* 1: 0252-0258.
 21. **Brumell, J. H., and Grinstein, S.** (2004) *Salmonella* redirects phagosomal maturation. *Curr Opin Microbiol* 7: 78-84.
 22. **Bruno, V. M., Hannemann, S., Lara-Tejero, M., Flavell, R. A., Kleinstein, S. H., and Galán, J. E.** (2009) *Salmonella* Typhimurium type III secretion effectors stimulate innate immune responses in cultured epithelial cells. *PLoS pathogens* 5: e1000538.
 23. **Bustamante, V. H., Martínez, L. C., Santana, F. J., Knodler, L. A., Steele-Mortimer, O., and Puente, J. L.** (2008) HilD-mediated transcriptional crosstalk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 14591-14596.
 24. **Büttner, D., and He, S. Y.** (2009) Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant physiol* 150: 1656-1664.
 25. **Callaway, T. R., Edrington, T. S., Anderson, R. C., Byrd, J. A., and Nisbet, D. J.** (2008) Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. *J Anim Sci* 86: E163-E172.
 26. **Carroll, R. K., Liao, X., Morgan, L. K., Cicirelli, E. M., Li, Y., Sheng, W., Feng, X., and Kenney, L. J.** (2009) Structural and Functional Analysis of the C-terminal DNA Binding Domain of the *Salmonella* typhimurium SPI-2 Response Regulator SsrB. *J Biol Chem* 284: 12008-12019.
 27. **Chang, J., Chen, J., and Zhou, D.** (2005) Delineation and characterization of the actin nucleation and effector translocation activities of *Salmonella* SipC. *Mol Microbiol* 55: 1379-1389.

-
28. **Chilcott, G. S., and Hughes, K. T.** (2000) Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 694-708.
 29. **Cirillo, D. M., Valdivia, R. H., Monack, D. M., and Falkow, S.** (1998) Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* 30: 175-188.
 30. **Coburn, B., Grassl G. A, and Finlay B. B.** (2007) *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol* 85: 112-118.
 31. **Cogan, T. A., and Humphrey, T. J.** (2003) The rise and fall of *Salmonella* Enteritidis in the UK. *J Appl Microbiol* 94: 114-119.
 32. **Collier-Hyams, L. S., Zeng, H., Sun, J., Tomlinson, A. D., Bao, Z. Q., Chen, H., Madara, J. L., Orth K., and Neish, A. S.** (2002) Cutting edge: *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF- κ B pathway. *J Immunol* 169: 2846-2850.
 33. **Cornelis, G. R.** (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4: 811-825.
 34. **Darwin, A. J., and Stewart, V.** (1996) The NAR modulon systems: nitrate and nitrite regulation of anaerobic gene expression. In *Regulation of gene expression in Escherichia coli*. Springer US p. 343-359.
 35. **Datsenko, K. A., and Wanner, B. L.** (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6640-6645.
 36. **Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S., and Hensel, M.** (1999) Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol* 31: 1759-1773.
 37. **Dillon, S. C., and Dorman, C. J.** (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol* 8: 185-195.
 38. **Drecktrah, D., Knodler, L. A., Galbraith, K., and Steele-Mortimer, O.** (2005) The *Salmonella* SPI1 effector SopB stimulates nitric oxide production long after invasion. *Cell Microbiol* 7: 105-113.
 39. **Edelman, R., and Levine, M. M.** (1986) Summary of an international workshop on typhoid fever. *Rev Infect Dis* 8: 329-49.
 40. **Ellermeier, C. D., and Slauch, J. M.** (2003) RtsA and RtsB coordinately regulate expression of the invasion and flagellar genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 185: 5096-5108.
 41. **Ellermeier, C. D., Ellermeier J. R., and 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.

-
42. **Ellermeier, J. R., and Slauch, J. M.** (2007) Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol* 10: 24-29.
 43. **Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M., and Hinton, J. C. D.** (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 47: 103-118.
 44. **Fàbrega, A., and Vila, J.** (2013) *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. *Clin Microbiol Rev* 26: 308-341.
 45. **Fahlen T. F., Wilson R. L., Boddicker J. D., and Jones B. D.** (2001) Hha is a negative modulator of transcription of *hilA*, the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion gene transcriptional activator. *J Bacteriol* 183: 6620-6629.
 46. **Fass, E., and Groisman, E. A.** (2009) Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol* 12: 199-204.
 47. **Feng, X., Oropeza, R., and Kenney, L. J.** (2003) Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* 48: 1131-1143.
 48. **Feng, X., Walthers, D., Oropeza, R., and Kenney, L. J.** (2004) The response regulator SsrB activates transcription and binds to a region overlapping OmpR binding sites at *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* 54: 823-835.
 49. **Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G., and Heffron, F.** (1986) Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Nat Acad Sci USA* 83: 5189-5193.
 50. **Fookes, M. S., Schroeder, G. N., Langridge, G. C., Blondel, C. J., Mammina, C., Connor, T. R., Seth-Smith, H., Vernikos, G. S., Robinson, K. S., Sanders, M., Petty, N. K., Kingsley, R. A., Bäumlner, A. J., Nuccio, S. P., Contreras, I., Santiviago, C. A., Maskell, D., Barrow, P., Humphrey, T., Nastasi, A., Roberts, M., Frankel, G., Parkhill, J., Dougan, G., and Thomson, N. R.** (2011) *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the Salmonellae. *PLoS Pathog* 7: e1002191. doi:10.1371/journal.ppat.1002191.
 51. **Fortune, D. R., Suyemoto, M., and Altier, C.** (2006) Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 74: 331-339.
 52. **Friebel, A., Ilchmann, H., Aepfelbacher, M., Ehrbar, K., Machleidt, W., and Hardt, W. D.** (2001) SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J Biol Chem* 276: 34035-34040.
 53. **Fu, Y., and Galán, J. E.** (1999) A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 401: 293-297.
 54. **Gal-Mor, O., and Finlay, B. B.** (2006) Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* 8: 1707-1719.
-

-
-
55. **Galán, J. E.** (1999) Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr Opin Microbiol* 2: 46-50.
 56. **Galán, J. E., and Wolf-Watz, H.** (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444: 567-573.
 57. **Gantois, I., Eeckhaut, V., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., and Van-Immerseel, F.** (2008) A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. *Avian Pathol* 37: 399-406.
 58. **Garcia-del Portillo, F., Foster, J. W., and Finlay, B. B.** (1993) Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun* 61: 4489-4492.
 59. **Garmendia, J., Beuzo, C. R., Ruiz-Albert, J., and Holden, D. W.** (2003) The roles of SsrA–SsrB and OmpR–EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system. *Microbiology* 149: 2385-2396.
 60. **Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., and Madara, J. L.** (2001) Bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 167: 1882-1885.
 61. **Golubeva, Y. A., Sadik, A. Y., Ellermeir, J. R., and Schlauch, J. M.** (2012) Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *Genetics* 190: 79-90.
 62. **Guo, A., Lasaro, M. A., Sirard, J. C., Kraehenbuhl, J. P., and Schifferli, D. M.** (2007) Adhesin-dependent binding and uptake of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by dendritic cells. *Microbiology* 153: 1059-1069.
 63. **Hacker J., and Kaper J. B.** (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54: 641-679.
 64. **Hansen-Wester, I., and Hensel, M.** (2001) *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microb Infect* 3: 549-559.
 65. **Haraga, A., and Miller, S. I.** (2003) A *Salmonella enterica* serovar typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF- κ B-dependent gene expression. *Infect Immun* 71: 4052-4058.
 66. **Haraga, A., Ohlson, M. B., and Miller, S. I.** (2008) *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* 6: 53-66.
 67. **Hardt, W. D., Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R., and Galán, J. E.** (1998). *S. typhimurium* Encodes an Activator of Rho GTPases that Induces Membrane Ruffling and Nuclear Responses in Host Cells. *Cell* 93: 815-826.
 68. **Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A.** (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099-1103.

-
69. **Hayward, R. D., and Koronakis, V.** (1999) Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *EMBO J* 18: 4926-4934.
 70. **Hensel, M., Shea, J. E., Waterman, S. R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F. C., and Holden, D. W.** (1998) Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* 30: 163-174.
 71. **Hensel, M., Nikolaus, T., and Egelseer, C.** (1999a). Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* pathogenicity Island 2. *Mol Microbiol* 31: 489-498.
 72. **Hensel, M., Hinsley, A. P., Nikolaus T., Sawers, G., and Berks, B. C.** (1999b) The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 32: 275-287.
 73. **Hensel, M.** (2004) Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 294: 95-102.
 74. **Hernandez, L. D., Hueffer, K., Wenk, M. R., and Galán, J. E.** (2004) *Salmonella* modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide metabolism. *Science* 304: 1805-1807.
 75. **Higashide, W., Dai, S., Hombs, V. P., and Zhou, D.** (2002) Involvement of SipA in modulating actin dynamics during *Salmonella* invasion into cultured epithelial cells. *Cell Microbiol* 4: 357-365.
 76. **Hoch, J. A.** (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* 3: 165-170.
 77. **Hoiseh, S. K., and Stocker, B. A.** (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238-239.
 78. **Jones, B. D., Ghori, N., and Falkow, S.** (1994) *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 180: 15-23.
 79. **Jones, B. D., and Falkow, S.** (1996) Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol* 14: 533-61.
 80. **Jones, B. D.** (2005) *Salmonella* Invasion Gene Regulation: A Story of Environmental Awareness. *J Microbiol* 43: 110-117.
 81. **Jonas, K., Edwards, A. N., Ahmad, I., Romeo, T., Römling, U., and Melefors, Ö.** (2010) Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella Typhimurium*. *Environ Microbiol* 12: 524-540.
 82. **Kabir, M. R., Hossain, M. A., Paul, S. K., Mahmud, C., Ahmad, S., Mahmud, N. U., Sultana, S., Yesmin, T., Hoque, S. M., Habiba, U., Rahman, M. A., and Kobayashi, N.**

-
- (2012) Enteropathogens associated with acute diarrhea in a tertiary hospital of Bangladesh. Mymensingh. *Med J* 21: 618-623.
83. **Kariuki, S., Revathi, G., Kariuki, N., Kiiru, J., Mwituria, J., and Hart, C. A.** (2006) Characterisation of community acquired non-typhoidal *Salmonella* from bacteraemia and diarrhoeal infections in children admitted to hospital in Nairobi, Kenya. *BMC Microbiol* 6: 101.
84. **Karlinsey, J. E., Tanaka, S., Bettenworth, V., Yamaguchi, S., Boos, W., Aizawa, S., and Hughes, K. T.** (2000) Completion of the hook-basal body complex of the *Salmonella typhimurium* flagellum is coupled to FlgM secretion and *fliC* transcription. *Mol Microbiol* 37: 1220-1231.
85. **Kelly, A., Goldberg, M. D., Carroll, R. K., Danino, V., Hinton, J. C., and Dorman, C. J.** (2004) A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* 150: 2037-2053.
86. **Kraehenbuhl, J. P., and Neutra, M. R.** (2000) Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 301-332.
87. **Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J. E., and Aizawa, S. I.** (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 280: 602-605.
88. **Kucharzik, T., Lügering, N., Rautenberg, K., Lügering, A., Schmidt, M. A., Stoll, R., and Domschke, W.** (2000) Role of M cells in intestinal barrier function. *Ann NY Acad Sci* 915: 171-183.
89. **Kuhle, V., and Hensel, M.** (2004) Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci* 61: 2812-2826.
90. **Kutsukake, K., and Iino, T.** (1994) Role of the FliA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 176: 3598-3605.
91. **Kutsukake, K.** (1997) Autogenous and global control of the flagellar master operon, *flhD*, in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* 254: 440-448.
92. **Kutsukake, K., Ikebe, T., and Yamamoto, S.** (1999) Two novel regulatory genes, *fliT* and *fliZ*, in the flagellar regulon of *Salmonella*. *Genes Genet Syst* 74: 287-292.
93. **Lawhon, S. D., Frye, J. G., Suyemoto, M., Porwollik, S., McClelland, M., and Altier, C.** (2003) Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 48: 1633-1645.
94. **Lawley, T. D., Chan, K., Thompson, L. J., Kim, C. C., Govoni, G. R., and Monack, D. M.** (2006) Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* 2: e11.
-

-
-
95. **Lee, A. K., Detweiler, C. S., and Falkow, S.** (2000) OmpR Regulates the Two-Component System SsrA-SsrB in *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *J Bacteriol* 182: 771-781.
 96. **Linehan, S. A., Rytönen, A., Yu, X. J., Liu, M., and Holden, D. W.** (2005) SlyA regulates function of *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) and expression of SPI-2-associated genes. *Infect Immun* 73: 4354-4362.
 97. **Liu, M. Y., Yang, H., and Romeo, T.** (1995) The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J Bacteriol* 177: 2663-2672.
 98. **Liu, X., and Matsumura, P.** (1995) The C-terminal region of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase is required for transcriptional activation of the flagellar level II operons by the FlhD/FlhC complex. *J Bacteriol* 177: 5186-5188.
 99. **Liu, M., Gui, G., Wei, B., Preston, J. F., Oakford, L., Yuksel, U., Giedroc, D. P., and Romeo, T.** (1997) The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 272: 17502-17510.
 100. **Löber, S., Jäckel, D., Kaiser, N., and Hensel, M.** (2006) Regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes by independent environmental signals. *Int J Med Microbiol* 296: 435-447.
 101. **Lostroh, C. P., and Lee, C. A.** (2001) The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microb Infect* 3: 1281-1291.
 102. **Lundberg, U., Vinatzer, U., Berdnic, D., von Gabain, A., and Baccarini, M.** (1999) Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol* 181: 3433-3437.
 103. **Macnab, R.M.** (1999) Components of the *Salmonella* Flagellar Export Apparatus. *J Bacteriol* 181: 1388-1394.
 104. **Macnab, R. M.** (2003) How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* 57: 77-100.
 105. **Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G., and Finlay, B. B.** (2000) *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* 2: 145-156.
 106. **Marlovits, T. C., and Stebbins, C. E.** (2010) Type III secretion systems shape up as they ship out. *Curr Opin Microbiol* 13: 47-52.
 107. **Martínez, L. C., Yakhnin, H., Camacho, M. I., Georgellis, D., Babitzke, P., Puente, J. L., and Bustamante, V. H.** (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: 1637-1656.
 108. **Martínez, L. C., Martínez-Flores, I., Salgado, H., Fernández-Mora, M., Medina-Rivera, A., Puente, J. L., Collado-Vides, J., and Bustamante, V. H.** (2014) *In Silico* Identification and Experimental Characterization of Regulatory Elements Controlling the Expression of the *Salmonella csrB/C* Genes. *J Bacteriol* 196: 325-336.

-
-
109. **Mayer, M. P.** (1995) A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* 163: 41-46.
 110. **Majowicz, S. E., Musto, J. A., and Scallan, E.** (2010) The global burden of non-typhoidal salmonellosis. *CID* 50: 882-889.
 111. **Matsui, M., Takaya, A., and Yamamoto, T.** (2008) σ^{32} -mediated negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 expression. *J Bacteriol* 190: 6636-6645.
 112. **McGhie, E. J., Hayward, R. D., and Koronakis, V.** (2001) Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. *EMBO J* 20: 2131-2139.
 113. **McGhie, E. J., Brawn, L. C., Hume, P. J., Humphreys, D., and Koronakis, V.** (2009) *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol* 12: 117-124.
 114. **Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., and Tauxe, R. V.** (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5: 607-625.
 115. **Merican, I.** (1997) Typhoid fever: present and future. *Med J Malaysia* 52: 299-308.
 116. **Miao, E. A., Andersen-Nissen, E., Warren, S. E., and Aderem, A.** (2007) TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol* 29: 275-288.
 117. **Moest, T. P., and Méresse, S.** (2013) *Salmonella* T3SSs: successful mission of the secret (ion) agents. *Curr Opin Microbiol* 16: 38-44.
 118. **Mota, L. J., and Cornelis, G. R.** (2005) The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann Med* 37: 234-249.
 119. **Navarre, W. W., Halsey, T. A., Walthers, D., Frye, J., McClelland, M., Potter, J. L., Kenney, L. J., Gunn, J. S., Fang, F. C., and Libby, S. J.** (2005) Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Mol Microbiol* 56: 492-508.
 120. **Ochman, H., Soncini, F. C., Solomon, F., and Groisman, E. A.** (1996) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7800-7804.
 121. **Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H., and Iino, T.** (1990) Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* 221: 139-47.
 122. **Olekhovich, I. N., and Kadner, R. J.** (2002) DNA-binding activities of the HilC and HilD virulence regulatory proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 184: 4148-4160.

-
-
123. **Olekhovich I. N., and 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.
 124. **Olekhovich, I. N., and Kadner, R. J.** (2007) Role of nucleoid-associated proteins Hha and H-NS in expression of *Salmonella enterica* activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion. *J Bacteriol* 189: 6882-6890.
 125. **Pallen, M. J., Beatson, S. A., and Bailey, C. M.** (2005) Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiol Rev* 29: 201-229.
 126. **Pallen, M. J., and Matzke, N. J.** (2006) From *The Origin of Species* to the origin of bacterial flagella. *Nature Rev Microbiol* 4: 784-790.
 127. **Patel, J. C., and Galán, J. E.** (2006) Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol* 175: 453-463.
 128. **Pegues, D. A., Hantman, M. J., Behlau, I., and Miller, S. I.** (1995) PhoP/PhoQ transcriptional repression of *Salmonella typhimurium* invasion genes: evidence for a role in protein secretion. *Mol Microbiol* 17: 169-181.
 129. **Perrett, C. A., and Jepson, M. A.** (2009) Regulation of *Salmonella*-induced membrane ruffling by SipA differs in strains lacking other effectors. *Cell Microbiol* 11: 475-487.
 130. **Prouty, A. M., Brodsky, I. E., Falkow, S., and Gunn, J. S.** (2004) Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* 150: 775-783.
 131. **Rabin, R. S., and Stewart, V.** (1993) Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 175: 3259-3268.
 132. **Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R. P., Dusold, R., Rubino, S., and Bäumlner, A. J.** (2005) The Vi capsular antigen of *Salmonella enterica* serotype Typhi reduces Toll-like receptor-dependent interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. *Infect Immun* 73: 3367-3374.
 133. **Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R. P., Tukel, C., Akcelik, M., and Bäumlner, A. J.** (2006) Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect Immun* 74: 19-27.
 134. **Rhen, M., and Dorman, C. J.** (2005) Hierarchical gene regulators adapt *Salmonella enterica* to its host milieus. *Int J Med Microbiol* 294: 487-502.
 135. **Rudolph, M. G., Weise, C., Miold, S., Hillenbrand, B., Bader, B., Wittinghofer, A., and Hardt, W. D.** (1999) Biochemical analysis of SopE from *Salmonella typhimurium*, a highly efficient guanosine nucleotide exchange factor for RhoGTPases. *J Biol Chem* 274: 30501-30509.

-
-
136. **Samudrala, R., Heffron, F., and McDermott, J. E.** (2009) Accurate Prediction of Secreted Substrates and Identification of a Conserved Putative Secretion Signal for Type III Secretion Systems. *PLoS Pathog* 5: e1000375. doi:10.1371/journal.ppat.1000375.
 137. **Santos, R. L., Zhang, S., Tsolis, R. M., Kingsley, R. A., Adams, L. G., and Bäumlér, A. J.** (2001) Animal models of *Salmonella* infections: enteritis vs. typhoid fever. *Microb Infect* 3: 1335-1344.
 138. **Santos, R. L., Tsolis, R. M., Bäumlér, A. J., and Adams, L. G.** (2003) Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. *Braz J Med Biol Res* 36: 3-12.
 139. **Schechter, L. M., Jain, S., Akbar, S., and Lee, C. A.** (2003) The Small Nucleoid-Binding Proteins H-NS, HU, and Fis Affect *hilA* expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infect Immun* 71: 5432-5435.
 140. **Schlumberger, M. C., and Hardt, W. D.** (2005) Triggered phagocytosis by *Salmonella*: bacterial molecular mimicry of RhoGTPase activation/deactivation. *Curr Top Microbiol Immunol* 291: 29-42.
 141. **Schmidt, H., and Hensel, M.** (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 17: 14-56.
 142. **Schmitt, C. K., Ikeda, J. S., Darnell, S. C., Watson, P. R., Bispham, J., Wallis, T. S., Weinstein, D. L., Metcalf, E. S., and O'Brien, A. D.** (2001) Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infect Immun* 69: 5619-5625.
 143. **Stecher, B., Hapfelmeier, S., Müller, C., Kremer, M., Stallmach, T., and Hardt, W. D.** (2004) Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin pretreated mice. *Infect Immun* 72: 4138-4150.
 144. **Steele-Mortimer, O., Méresse, S., Gorvel, J. P., Toh, B. H., and Finlay, B. B.** (1999) Biogenesis of *Salmonella* typhimurium-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol* 1: 33-49.
 145. **Stender, S., Friebe, A., Linder, S., Rohde, M., Miold, S., and Hardt, W. D.** (2000) Identification of SopE2 from *Salmonella* typhimurium, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol Microbiol* 36: 1206-1221.
 146. **Takaya, A., Tomoyasu, T., Tokumitsu, A., Morioka, M., and Yamamoto, T.** (2002) The ATP-dependent Lon protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium regulates invasion and expression of genes carried on *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol* 184: 224-232.
 147. **Takaya, A., Kubota, Y., Isogai, E., and 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.

-
148. **Takaya, A., Erhardt, M., Karata, K., Winterberg, K., Yamamoto, T., and Hughes, K. T.** (2012) YdiV: a dual function protein that targets FlhDC for ClpXP-dependent degradation by promoting release of DNA-bound FlhDC complex. *Mol Microbiol* 83: 1268-1284.
149. **Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M., and Euzéby, J. P.** (2005) Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 521-524.
150. **Tomljenovic-Berube, A. M., Mulder, D. T., Whiteside, M. D., Brinkman, F. S. L., and Coombes, B. K.** (2010) Identification of the Regulatory Logic Controlling *Salmonella* Pathoadaptation by the SsrA-SsrB Two-Component System. *PLoS Genet* 6: e1000875.
151. **Uchiya, K. I., Barbieri, M. A., Funato, K., Shah, A. H., Stahl, P. D., and Groisman, E. A.** (1999) A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J* 18: 3924-3933.
152. **Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesús, J., Platt, D. J., and Olsen, J. E.** (2000) Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect* 125: 229-255.
153. **Van Der Velden, A. W., Bäumlér, A. J., Tsolis, R. M., and Heffron, F.** (1998) Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect Immun* 66: 2803-2808.
154. **Van-Gijsegem, F., Gough, C., Zischek, C., Niqueux, E., Arlat, M., Genin, S., Barberis, P., German, S., Castello, P., and Boucher, C.** (1995) The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Mol Microbiol* 15: 1095-1114.
155. **Vogel, J.** (2009) A rough guide to the non-coding RNA world of *Salmonella*. *Mol Microbiol* 71: 1-11.
156. **Walthers, D., Carroll, R. K., Navarre, W. W., Libby, S. J., Fang, F. C., and Kenney, L. J.** (2007) The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol* 65: 477-493.
157. **Walthers, D., Li, Y., Liu, Y., Anand, G., Yan, J., and Kenney, L. J.** (2011) *Salmonella enterica* response regulator SsrB relieves H-NS silencing by displacing H-NS bound in polymerization mode and directly activates transcription. *J Biol Chem* 286: 1895-1902.
158. **Wang, Q., Zhao, Y., McClelland, M., and Harshey, R. M.** (2007) The RcsCDB signaling system and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes. *J Bacteriol* 189: 8447-8457.
159. **Wei, B. L., Brun-Zinkernagel, A. M., Simecka, J. W., Prüß, B. M., Babitzke, P., and Romeo, T.** (2001) Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 40: 245-256.
-

-
-
160. **Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A. K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C. S., Georgellis, D., Babitzke, P., and Romeo, T.** (2003) A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 48: 657-670.
 161. **Woestyn, S., Allaoui, A., Wattiau, P., and Cornelis, G. R.** (1994) YscN, the putative energizer of the Yersinia Yop secretion machinery. *J Bacteriol* 176: 1561-1569.
 162. **Xiao, G., Cole, D. L., Gunsalus, R. P., Sigman, D. S., and Chen, C. H.** (2002) Site-specific DNA cleavage of synthetic NarL sites by an engineered *Escherichia coli* NarL protein-1, 10-phenanthroline cleaving agent. *Prot Sci* 11: 2427-2436.
 163. **Zeng, H., Carlson, A. Q., Guo, Y., Yu, Y., Collier-Hyams, L. S., Madara, J. L., Gewirtz, A. T., and Neish, A. S.** (2003) Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. *J Immunol* 171: 3668-3674.
 164. **Zhou, D., Hardt, W. D., and Galan, J. E.** (1999a) *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect Immun* 67: 1974-1981.
 165. **Zhou, D., Mooseker, M. S., and Galán, J. E.** (1999b) An invasion-associated *Salmonella* protein modulates the actin-bundling activity of plastin. *Proc Nat Acad Sci USA* 96: 10176-10181.
 166. **Zhou, D., Chen, L. M., Hernandez, L., Shears, S. B., and Galán, J. E.** (2001) A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol* 39: 248-260.