



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**“Identificación de las Señales y Elementos Genéticos que Regulan
la Expresión del Sistema CRISPR/Cas en *Salmonella enterica*
serovar Typhi en Medio Mínimo-N”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JAVIER ESTEBAN REBOLLAR FLORES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. ISMAEL HERNÁNDEZ LUCAS, FACULTAD DE CIENCIAS-UNAM.

COMITÉ TUTOR:

**DR. JUAN MIRANDA RÍOS, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS-
UNAM.**

DR. DANIEL GENARO SEGURA GONZALEZ, FACULTAD DE CIENCIAS-UNAM.

MÉXICO, D.F. ABRIL DEL 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**“Identificación de las Señales y Elementos Genéticos que Regulan
la Expresión del Sistema CRISPR/Cas en *Salmonella enterica*
serovar Typhi en Medio Mínimo-N”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JAVIER ESTEBAN REBOLLAR FLORES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. ISMAEL HERNÁNDEZ LUCAS, FACULTAD DE CIENCIAS-UNAM.

COMITÉ TUTOR:

**DR. JUAN MIRANDA RÍOS, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS-
UNAM.**

DR. DANIEL GENARO SEGURA GONZALEZ, FACULTAD DE CIENCIAS-UNAM.

MÉXICO, D.F. ABRIL DEL 2015



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/211/15

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **23 de febrero de 2015** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **REBOLLAR FLORES JAVIER ESTEBAN** con número de cuenta **512012830** con la tesis titulada "**Identificación de las señales y elementos genéticos que regulan la expresión del sistema CRISPR/Cas en *Salmonella enterica* serovar Typhi en medio mínimo-N**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. ISMAEL HERNÁNDEZ LUCAS**:

Presidente: DR. DIMITRIS GEORGELLIS
Vocal: DRA. BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO
Secretario: DR. JUAN MIRANDA RÍOS
Suplente: DR. ALEJANDRO GARCÍA DE LOS SANTOS
Suplente: DR. DANIEL GENARO SEGURA GONZÁLEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de marzo de 2015

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/grf*



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A CONACYT, por otorgarme una beca de manutención apoyando la realización de presente proyecto.

A los miembros del Comité Tutor por su valioso apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Estoy completamente contento y agradecido de manera especial por la contribución de los miembros del comité evaluador, conformado por el Dr. Ismael Hernández Lucas, Dr. Juan Miranda Rios y Dr. Daniel Genaro Segura, su participación fue fundamental para los avances de este proyecto; además me incitaron positivamente para afinar mi formación académica. Menciono de manera especial al Dr. Ismael Hernández Lucas, por ser un tutor entregado, innovador, una persona honesta y directa; por su siempre oportuna ayuda, guía y consejos.

A la M. en C. Liliana Medina Aparicio con quien compartí mesa de trabajo, colaboradora indispensable para este proyecto, por su paciencia, ayuda y consejos.

A Noé-Trotsky (M. en C. Noé Becerra Lobato) por su ayuda en los experimentos de geles SDS-PAGE, por su amistad y por hacerme reír vehementemente con sus originales comentarios.

Al Dr. José Miguel Villarreal Ascencio por su apoyo altruista en el trabajo, su disponibilidad y entrega para responder o brindar apoyo en cuestiones técnicas, siempre será algo que admiraré de este increíble Joven Investigador. ¡Gracias José!

Al Dr. Edmundo Calva y Dr. José Luis por su solidaridad y permitirme trabajar en su laboratorio.

A la Dra. Alejandra Vázquez por su apoyo con las cepas mutantes y su amistad.

Al M.C. Abraham Medrano López y la Dra. Verónica Martínez Santos por su cortés y oportuna ayuda laboral.

Al experto en técnicas moleculares **#MarcoBeach** (M. en C. Marcos Fernández Mora) por su valiosa ayuda experimental.

Al Dr. Ricardo Oropeza, M. en C. Francisco J. Santana por su apoyo técnico y amistad.

A Todos los miembros de los Grupos de trabajo Calva/Puente, quienes amablemente siempre brindaron su ayuda, consejo y simpatía.

A Elvira Villa Herrera, Rebeca Herrera Trujillo por su apoyo con material de laboratorio.

A mis amigos **#ChubiesRegordetes** (Biol. Irving Giovanni Archundia Jiménez, M en C. Mauricio Díaz Sánchez y al Biol. Juan Jesús Luna) por su apoyo con material de laboratorio, amistad, honestidad y consejos.

Agradezco a la Biol. Diana Guerrero Ulloa por su valiosa ayuda, amistad, consejos, por ser conejillo de prueba al escucharme antes de mis evaluaciones tutoriales, por acompañarme los domingos al laboratorio y hacer menos pesados esos días de trabajo, además de sus valiosas clases de ortografía. Por ser bien buena con los experimentos de PCR y las clonas excelentes que me brindó ¡Gracias Diana!
¡Gracias!

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a las instituciones y personas que participaron en el desarrollo de este proyecto. Sin embargo, principalmente enfatizo mis agradecimientos y la dedicatoria a tres personas; a mi querido y siempre atento Papá Esteban Rebollar T. A quien amo y respeto, en este proyecto siempre me brindaste apoyo incondicional. De la misma manera cito a la luz de mi alegría, mi Mamá hermosa Ma. de los Angeles Flores F. que todos los días estuviste atenta en mi salud física, mental y moral, tu apoyo siempre ha sido de total entrega y altruismo, te amo “Jefashion”. Gracias por su ayuda en todo sentido, por que permitieron sobrellevar este proyecto de vida de forma armoniosa. Su aliento, preocupación y orgullo siempre me impulsó a seguir adelante y no desistir. Gracias, los amo.

Finalmente este trabajo se lo dedico a mi hijo Ángel Jhael, quien me brindaba motivación para finalizar este proyecto. Pipo, espero que estés orgulloso de tu Papi y de alguna forma logres ver que la enseñanza académica y de vida que ínsito sea tuya, yo también lo trato de aplicar en mi trabajo y en la vida. Gracias por tu paciencia te amo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
<i>Género Salmonella</i>	7
Vía de infección y patogénesis de <i>Salmonella</i>	9
<i>Salmonella</i> en su interacción con las células del intestino delgado	9
Sistema CRISPR/Cas	13
Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas	14
Etapa de adaptación	14
Etapa de expresión	14
Interferencia	15
ATECEDENTES	22
Sistema CRISPR/Cas en <i>S. Typhi</i>	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	26
Manipulación de DNA	26

Construcción de fusiones transcripcionales al gen reportero <i>cat</i>	27
Ensayos de expresión de las fusiones transcripcionales al gen reportero <i>cat</i>	28
Construcción de cepas mutantes	29
Electroforesis de proteínas.	29
RT-PCR	30
“Primer extensión”	30
Cepas, plásmidos y oligonucleótidos	31
RESULTADOS	39
Unidades transcripcionales del sistema CRISPR/Cas en MM-N	39
Identificación de RNAs antisentidos del sistema CRISPR/Cas	44
Identificación de un promotor antisentido del locus CRISPR/Cas	45
Efecto del pH en la regulación transcripcional del sistema CRISPR/Cas	49
Delimitación de la región promotora de <i>casB</i> -450/+181 regulada por pH	51
<i>casB</i> origina una proteína y un RNA pequeño a partir de promotores independientes	54
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	62
LITERATURA CITADA	63

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.	31
Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.	34
Tabla 3. Antibióticos utilizados en este trabajo.	35
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	36
Fig. 1. Distribución geográfica de la fiebre tifoidea.	8
Fig. 2. Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas.	16
Fig. 3. organización genética y mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas tipo II.	18
Fig. 4. Edición de DNA mediante un sistema artificial CRISPR/Cas tipo II.	20
Fig. 5. Aplicaciones del sistema CRISPR/Cas tipo II.	21
Fig. 6. Organización genética del sistema CRISPR/Cas en <i>S. Typhi</i> IMSS-1.	22
Fig. 7. Mapa genético del vector pKK232-8.	27
Fig. 8. Identificación de las unidades transcripcionales del sistema CRISPR/Cas mediante RT-PCR.	39
Fig. 9. Perfil transcripcional de diferentes regiones del locus CRISPR/Cas en <i>S. Typhi</i>.	40
Fig. 10. Fusiones transcripcionales de la región promotora de <i>casA</i>.	41
Fig. 11. Fusiones transcripcionales de la región promotora de <i>casA</i> en <i>S. Typhi</i> ΔCRISPR/Cas.	42
Fig. 12. Representación esquemática de los productos de RT-PCR para detectar RNAs antisentidos del sistema CRISPR/Cas en <i>S. Typhi</i>.	44
Fig. 13. Esquema del “primer extesion” del promotor antisentido en <i>casB</i>.	45
Fig. 14. Perfil transcripcional del promotor antisentido <i>casBA</i> (pRS415+181/-450) en <i>S. Typhi</i> IMSS-1.	46
Fig. 15. “Primer extesion” de promotor antisentido de <i>casB</i> en diferente pH.	47

Fig. 16. Perfil de expresión del promotor de <i>casB</i> (<i>PcasB</i>-450/+181) en diferentes pHs, evaluado en MM-N Tris 200 mM.	49
Fig. 17. Perfil transcripcional del promotor <i>casB</i> (<i>PcasB</i>-450/+181) en <i>S. Typhi</i> durante fase de adaptación, exponencial y estacionaria, evaluado en diferentes pHs.	50
Fig. 18. Perfil de actividad β-Galactosidasa del Promotor <i>casB</i> (<i>PcasB</i>-450/+181) en <i>S. Typhi</i> IMSS-1.	51
Fig. 19. Expresión transcripcional en diferentes fusiones de la región reguladora de <i>casB</i>.	52
Fig. 20. Fusiones transcripcionales de la región 3' de <i>PcasB</i>.	53
Fig. 21. Perfil electroforético de CasB.	55

RESUMEN

El sistema CRISPR/Cas es un mecanismo bacteriano de defensa contra fagos y elementos genéticos móviles. En investigaciones previas definimos que este “cluster” genético es regulado positivamente por LeuO, negativamente por H-NS y LRP. En el presente estudio establecimos que el sistema CRISPR/Cas de *S. Typhi* forma cinco unidades transcripcionales en medio mínimo-N (MM-N). La primer unidad transcripcional es un RNA policistrónico conformado por *casA-casB-casC-casD-casE-casI-cas2-CRISPR*. El segundo transcrito comprende los nucleótidos +142 al +181 respecto del ATG de *casB* y se expresa en pH 7.5. El tercer RNA es un antisentido, codificado en la hebra complementaria del sistema CRISPR/Cas, que se extiende desde *casB* a *casA* (dirección 3'-5'). Este antisentido se expresa en MM-N pH 7.5. Los últimos elementos genéticos corresponden a dos RNAs antisentidos; uno de ellos comprende de *casI* a *casD* (dirección 3'-5'); el último RNA antisentido se detectó en la hebra complementaria de *cas2*. Por lo tanto, existe la posibilidad de que estos dos antisentidos en realidad sean un solo transcrito. Los datos obtenidos sugieren que los antisentidos, reportados en este estudio, podrían ser utilizados para modular la expresión del sistema operón *casA-casB-casC-casD-casE-casI-cas2-CRISPR*, por lo tanto, *S. Typhi* utilizaría diferentes mecanismos moleculares, como RNAs antisentidos y proteínas represoras, tales como H-NS y LRP, en la regulación transcripcional de este operón. Finalmente, nuestros resultados contribuyen al entendimiento de las diferentes estrategias genéticas utilizadas por las bacterias para regular la expresión del “cluster” genético CRISPR/Cas.

ABSTRACT

The CRISPR/Cas is a bacterial immunological genetic system against phage and foreign DNA or RNA. In a previous research we defined that in *S. Typhi* the CRISPR/Cas cluster is a LeuO-dependent operon silenced by H-NS and LRP. In the present study we established that this cluster forms five transcriptional units in N-minimal medium (MM-N). The first one is a polycistronic mRNA composed by *casA-casB-casB-casC-casD-casE-casI-cas2-CRISPR*. The second mRNA includes the nucleotides +142 to +181 regarding to the ATG of *casB* and it is expressed in pH 7.5. The third RNA element is an antisense encoded by the complementary strand of *casB* and *casA* and was also detected in MM-N pH 7.5. Both the fourth and fifth elements reported here are antisense RNAs, encoded from *casI* to *casD* and *cas2* respectively. Hence, probably these antisense RNAs function as transcriptional regulators of the CRISPR/Cas cluster. Therefore, our results suggest that *S. Typhi* uses antisense RNAs and repressors, such as H-NS and LRP, in the transcriptional regulation of *casA-casB-casB-casC-casD-casE-casI-cas2-CRISPR* operon.

INTRODUCCIÓN

Género *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la rama γ de las proteobacterias y forma parte de la familia enterobacteriaceae. *Salmonella* está conformada por dos especies, *Salmonella enterica* (*S. enterica*) y *Salmonella bongori* (*S. bongori*). *S. enterica* se ha dividido en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (Le Minor y Popoff, 1987; Brenner *et al.*, 2000).

La subespecie más estudiada es *S. enterica*, de la cual se han identificado más de 2 500 serotipos de acuerdo a la Organización Mundial de Salud (WHO). Estos serotipos han sido clasificados en base a los antígenos capsulares (Vi), flagelares (H) y el lipopolisacárido (O) (Scherer y Miller, 2001). *S. enterica* agrupa bacterias patógenas de humanos y animales; estas pueden causar infecciones gastrointestinales e infecciones sistémicas severas. *S. Typhimurium* causa gastroenteritis en humanos (Scherer y Miller, 2001). Esta enfermedad provoca una infección localizada en el intestino y nodos linfáticos mesentéricos (Raffatellu *et al.*, 2006). Los pacientes infectados con este patógeno, generalmente presentan dolor abdominal, diarrea con o sin sangre (asociada con inflamación del intestino grueso), náusea y vómito (Zhang *et al.*, 2003; Coburn *et al.*, 2007). El período de incubación es de 6 a 72 h y <10 días de padecimientos (Glynn y Palmer, 1996; Raffatellu *et al.*, 2006; Fàbrega y Vila, 2013).

Otra serovariedad importante es *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), agente causal de la fiebre tifoidea, una enfermedad sistémica y febril que afecta únicamente al ser humano (Sánchez-Martínez *et al.*, 2002). La fiebre tifoidea se encuentra difundida en todo el planeta, con mayor frecuencia en países subdesarrollados. Al año se estiman cerca de 21 650 974 casos de fiebre tifoidea en todo el mundo; de los cuales 216 510 son fatales (Crump *et al.*, 2004, Gunaratnam *et al.*, 2014). *S. Typhi* coloniza intestino delgado, hígado, bazo, médula ósea y nodos linfáticos mesentéricos. Su periodo de incubación es de 5 a 9 días y los síntomas de la enfermedad pueden prevalecer más de 3 semanas (Raffatellu *et al.*, 2006). El primer signo de infección es la enterocolitis, fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, debilidad, vértigo y dolor muscular (Jones y Falkow, 1996). Individuos con esta enfermedad pueden presentar perforaciones intestinales, acompañada de hipotensión y finalmente la muerte (WHO, Mogasale *et al.*, 2014).

Debido a lo anterior, y a la predominancia de cepas resistentes a los antibióticos utilizados en el tratamiento de la fiebre tifoidea (cloranfenicol, ampicilina, fluoroquinolonas, cefalosporinas, ácido nalidíxico etc.) (Mirza *et al.*, 1996), la fabricación de vacunas capaces de inducir una respuesta inmune eficaz, es un paso crítico en la erradicación de ésta enfermedad que representa un grave problema de salud mundial.

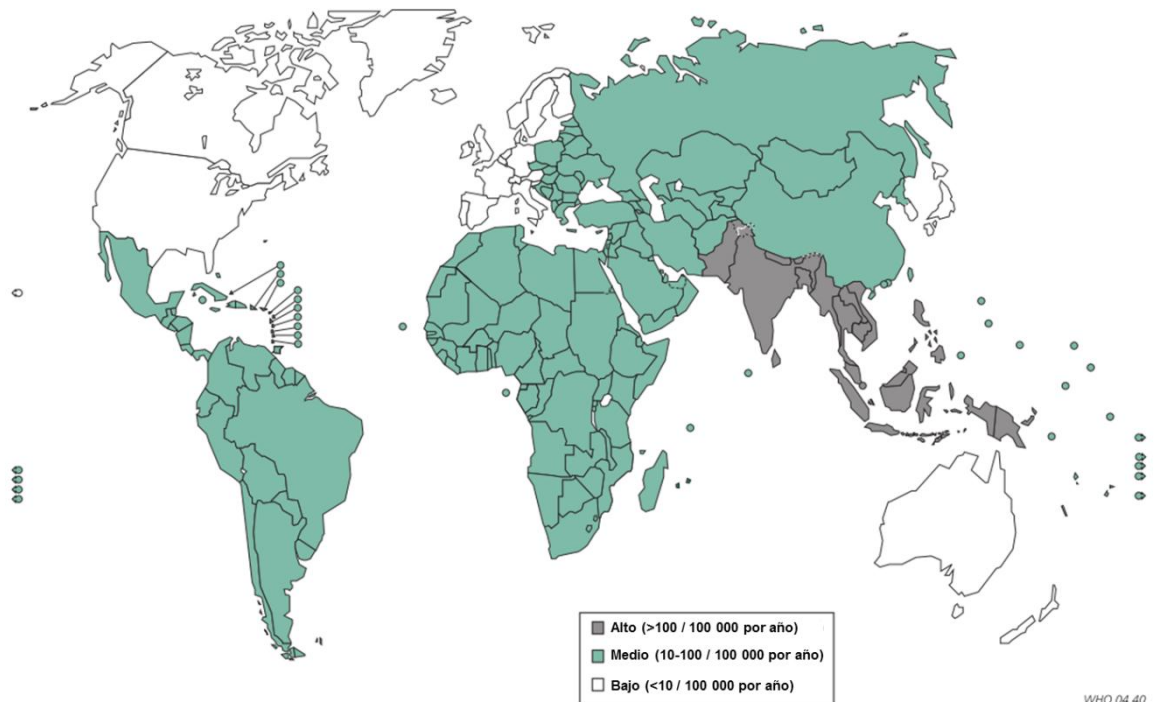


Fig. 1 Distribución geográfica de la fiebre tifoidea. Se indica en código de colores el número de casos por cada 100 000 personas al año.

S. Typhimurium puede ocasionar una infección intestinal localizada o una infección sistémica similar a la fiebre tifoidea en el modelo múrido (Coburn *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2003, Bowe *et al.*, 1998), por ello es un importante modelo de estudio para entender los mecanismos moleculares por medio de los cuales *S. enterica* interactúa con las células del hospedero (Haraga *et al.*, 2008). Con base en los estudios realizados en *S. Typhimurium*, se describirá el mecanismo general de infección propuesto para esta enterobacteria.

Vía de infección y patogénesis de *Salmonella*

La ruta natural de infección para *Salmonella* es la vía oral, a través de agua y alimentos contaminados (Calva *et al.*, 198; WHO). La dosis mínima infecciosa en voluntarios humanos varía de 1×10^3 a 1×10^6 unidades formadoras de colonia (Scherer y Miller, 2001; Hornick *et al.*, 1970).

En el proceso de infección, *Salmonella* atraviesa la barrera del estómago y sobrevive al pH ácido. Para lograrlo, este patógeno cuenta con una respuesta adaptativa de tolerancia ácida (ATR), en donde más de 50 proteínas de choque ácido (APSS) son requeridas (Valdivia *et al.*, 1996; Nair y Finkel, 2004; Foster, 1991; Foster *et al.*, 1994, García-del Portillo *et al.*, 1993), los reguladores principales de esta respuesta son RpoS, Fur (Foster *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1994;) y EnvZ/OmpR (Bang *et al.*, 2000 y 2002). Gracias a estos elementos genéticos *Salmonella* sobrevive al pH ácido y logra ubicarse en el intestino delgado.

***Salmonella* en su interacción con las células del intestino delgado**

La primera fracción del intestino delgado, el duodeno, representa un reto importante para la sobrevivencia de *Salmonella*, en este compartimento se liberan sales biliares, la disponibilidad de oxígeno disminuye y la presión osmótica incrementa por una alta concentración de nutrientes.

Las sales biliares son capaces de alterar la estabilidad de la membrana y provocar la lisis bacteriana. Para reducir la acción lítica de estos componentes, *Salmonella* expresa los genes *tolR* y *wec*, que codifican para una proteína de membrana y un glicolípido respectivamente, estos elementos genéticos están implicados en preservar la integridad de la membrana (Rychlik y Barrow, 2005). Se propone además, que las modificaciones en el lípido-A, podrían reducir la permeabilidad de sales biliares (Rychlik y Barrow, 2005). Recientemente reportamos que la cascada de regulación LtrR-OmpR-OmpC de *S. Typhi*, está implicada en la resistencia a deoxicolato de sodio, sal biliar más abundante en el intestino humano (Villarreal *et al.*, 2014).

Tanto sales biliares como una alta concentración de solutos en el intestino, representan un ambiente hipertónico para la bacteria, *Salmonella* logra mantener la turgencia celular incrementando concentración de los solutos potasio, betaina, prolina, trehalosa y glutamato; la acumulación de estos compuestos es controlada por ProU, RpoS y OsmU (Sutherland *et al.*,

1986; Csonka *et al.*, 1988 y 1994; Kim *et al.*, 2013). Una alta presión osmótica es censada por el sistema de dos componentes EnvZ/OmpR, como resultado, la porina de membrana externa OmpF es sustituida por OmpC, la cual forma un poro de diámetro menor y decrementa el flujo de iones al periplasma (Chatfield, *et al.*, 1991; Graeme-Cook *et al.*, 1989).

Conforme avanza la bacteria en el tracto digestivo, la disponibilidad de oxígeno disminuye y *Salmonella* debe realizar un cambio de metabolismo aerobio a anaerobio. ArcB es una proteína sensora de membrana interna, que detecta el potencial reductor a través de quinonas locales y en condiciones de anaerobiosis fosforila al regulador de respuesta ArcA (Georgellis *et al.*, 2001; Malpica *et al.*, 2004), el cual modula la expresión de genes involucrados en metabolismo anaerobio y suprime genes de ciclo de Krebs (Nystrom *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 1994; Ailion *et al.*, 1993). ArcA también induce a *cydAB* (citocromo oxidasa), involucrada en la respiración bajo condiciones limitadas de O₂ (Nystrom *et al.*, 1996). El tetratoato de azufre es un compuesto reactivo con radicales libres de oxígeno y es producido por el sistema inmune en el intestino delgado, *Salmonella*, a través del regulador global Fnr (OxrA en *Salmonella*) induce el operón *ttr* y logra utilizar el tetratoato para la respiración celular (Price-Carter *et al.*, 2001). Se ha reportado que cepas de *S. Typhimurium arcA*⁻ u *oxrA*⁻, no muestran disminución en la virulencia o invasión (Lu *et al.*, 2002). No obstante, en una cepa de *S. Typhi oxrA*⁻, disminuye su invasión *in vivo* (Contreras *et al.*, 1997).

Para lograr establecer la infección, *Salmonella* tiene que contender con las defensas del sistema inmune innato del huésped y barreras fisicoquímicas contenidas en el lumen y mucosa del epitelio intestinal. Algunas de estas barreras son los péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs), presión osmótica, baja disponibilidad de oxígeno, bacteriocinas, la microbiota del huésped etc.

Los CAMPs interactúan con el lipopolisacárido (LPS) y se insertan en la bicapa lipídica bacteriana formando canales que generan una disminución del potencial de membrana y con ello la muerte del patógeno (Zhang *et al.*, 2003). La respuesta de *Salmonella* a la presencia de CAMPs, reside en la modificación del lípido-A, con ello evita el anclaje de los péptidos y la formación de poros (Guo *et al.*, 1997). Entre los genes involucrados en este proceso se encuentran *pmrAB*, sistema de dos componentes implicado en la resistencia a polimixina (Chen y Groisman, 2013); *pmrHFIJKL* operón necesario para la modificación del lípido-A, a partir de aminoarabinosa (Gunn, 2008; Johnson *et al.*, 2013); *pagP*, proteína de membrana externa involucrada en la biosíntesis del lípido-A; *pgtE*, proteasa de superficie

externa capaz de degradar componentes del sistema del complemento (C3b, C4b y C5) (Ramu *et al.*, 2007) y *pagL*, deacilasa del lípido-A. Los genes mencionados son regulados por PhoPQ (Behlau y Miller 1993; Gunn *et al.*, 1998).

Cuando *Salmonella* coloniza el intestino interacciona con la flora intestinal y compete por los recursos nutricionales (Stecher *et al.*, 2005; Richlik y Barrow, 2005). En este sentido, RpoS es un factor sigma que se induce en fase estacionaria y baja disponibilidad de fuentes de carbono, induciendo genes de repuesta a estrés. Algunos microorganismos de la microbiota son capaces de producir bacteriocinas y ácidos grasos de cadena corta que actúan de manera similar a los CAMPs (Liévin-Le *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2012; Richlik y Barrow, 2005).

Salmonella penetra la mucosa del yeyuno e íleon evadiendo la acción de enzimas digestivas, IgA, CAMPs, neutrófilos, macrófagos y otras defensas del sistema inmune innato (Prouty *et al.*, 2004; Haraga *et al.*, 2008). Para establecer la infección, *Salmonella* se adhiere a la superficie apical de las células epiteliales del intestino delgado, utilizando adhesinas fimbriales (Zhang *et al.*, 2000, Bäumlér *et al.*, 1996; Van Der Velden *et al.*, 1998). El flagelo y la fimbria curli son identificadas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), estimulan las vías de inflamación innata después de su reconocimiento por sus correspondientes receptores tipo Toll (TLR) (Zeng *et al.*, 2003).

Salmonella se adhiere e invade preferencialmente a través de las células M (especializadas en el transporte de antígenos hacia el tejido linfóide subyacente) del epitelio intestinal, en esta etapa el patógeno detecta alta osmolaridad, pH alcalino y disminución en la concentración de oxígeno del lumen intestinal, generando la activación del sistema de secreción tipo III (SST3) que incluye proteínas efectoras (SipA, SipC, SopE, SopE2, SopB y SptP) codificadas en la isla de patogenicidad uno (SPI-1), las cuales son transportadas al citoplasma de célula eucarionte (Raffatellu *et al.*, 2005; Schlumberger y Hardt, 2005; McGhie *et al.*, 2009; Hansen-Wester y Hensel, 2001) promoviendo la polimerización y ramificación de los filamentos de actina en la célula hospedera. Como consecuencia se forma un ondulamiento en la membrana llamado “ruffling”, evento que facilita la internalización de *Salmonella* a las células epiteliales (Haraga *et al.*, 2008, Sánchez-Jiménez y Cardona-Castro, 2003). Después de la entrada de *Salmonella*, la arquitectura normal de borde cepillo en la célula hospedera es restaurada a través de la proteína activadora de GTPasa (GAP), SptP (tirosin fosfatasa/GTPasa), la cual antagoniza a SopE, SopE2 y SopB (Zhang *et al.*, 2008; Fu y Galán, 1999).

Dentro de la célula huésped *Salmonella* produce efectos citotóxicos, ocasionando la destrucción de las células M (ulceración) y la invasión de enterocitos adyacentes (Figuroa y Verdugo, 2005). El proceso de invasión “ruffling” ocurre de manera similar en *S. Typhi* y *S. Typhimurium*. Sin embargo en la infección ocasionada por *S. Typhimurium* en humanos, SopB, SopE y SopE2 estimulan a Cdc42, la cual activa proteínas quinasas (MAPK) como Erk, JNK y p38 (factores transcripcionales), resultando en la producción de citosinas proinflamatorias como IL-8 (Boyle *et al.*, 2006), induciendo la respuesta secretora en el epitelio intestinal, que inicia con el reclutamiento y trans migración de fagocitos desde el espacio submucoide al lumen, provocando la inflamación intestinal y diarrea (gastroenteritis).

En humano, *S. Typhi* evita la respuesta inmune gracias a la presencia de su cápsula Vi, modificaciones del lipopolisacarido y represión del flagelo, reduciendo la producción de IL 8 por parte de las células del epitelio intestinal, evitando así el reclutamiento de neutrófilos, inflamación del intestino y la presencia de cuadros diarreicos (Sharma y Qadri, 2004).

S. Typhimurium en el modelo del ratón y *S. Typhi* en humanos, posterior a la infección, son capaces de sobrevivir y replicarse en diferentes tipos celulares (macrófago, célula M o célula epitelial), dentro en un fagosoma conocido como “*Salmonella* containing vacuole” (SCV) (Steele-Mortimer *et al.*, 1999). La acidificación de la SCV, combinado con la concentración limitada de cationes divalentes (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+}) y fosfato, estimula la expresión de la SPI-2, la cual codifica para un SST3 (Knodler y Steele-Mortimer, 2003; Cirillo *et al.*, 1998; Deiwick *et al.*, 1999; Garmendia *et al.*, 2003), el cual *Salmonella* utiliza para translocar 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). La función de estos efectores es localizar la SCV en un sitio favorable para la proliferación de *Salmonella* (Uchiya *et al.*, 1999; Beuzón *et al.*, 2001; Boucrot *et al.*, 2005). Los efectores SopB y SsaB modifican el transito vesicular, evitando la fusión de las SCVs con los lisosomas (Haraga *et al.*, 2008). Sin embargo, hay estudios que demuestran la sobrevivencia de *Salmonella* en SCV fusionadas con el lisosoma (Drecktrah *et al.*, 2005). El acumulamiento de actina alrededor de la SCV por acción de SspH2, SpvB y SseI, permite el mantenimiento de la integridad de la membrana vacuolar. Posteriormente la vacuola migra hasta una localización perinuclear. SseF y SseG promueven la agrupación de microtúbulos junto a la SCV. Una vez que la SCV está correctamente localizada, los efectores SseF, SifA y PipB2 inducen la formación de Sif (*Salmonella*-induced filament), que permiten el incremento de tamaño de la SCV. Después de

un periodo de adaptación (3-4 hrs) *Salmonella* puede replicarse en las SCV de la célula huésped (Brumell y Grinstein, 2004; Bakowski *et al.*, 2008). Cuando la bacteria sobrevive y prolifera dentro de los macrófagos se disemina por torrente sanguíneo, de esta manera la bacteria puede invadir bazo, hígado, médula ósea y vesícula biliar, nichos donde continua replicándose (Figuroa y Verdugo, 2005; Haraga *et al.*, 2008). La concentración de bacterias aumenta durante 3 a 4 días, alcanzando un número de 1×10^8 bacterias, provocando bacteriemia, choque endotóxico y finalmente la muerte del hospedante (Zhang *et al.*, 2003; Scherer y Miller, 2001; House *et al.*, 2001; Beuzon y Holden, 2001).

El mecanismo antes descrito ilustra las diferentes estrategias genéticas que *Salmonella* utiliza en el hospedante, sin embargo, ésta bacteria también se encuentra en vida libre, donde tiene que sobrevivir a presiones ambientales tales como competencia, ayuno, estrés osmótico y principalmente a depredación por fagos. En la naturaleza los procariontes son infectados continuamente por bacteriófagos, se calcula que los bacteriófagos diariamente exterminan el 90% de las poblaciones bacterianas en la biósfera, debido a lo cual, las bacterias han desarrollado diversas estrategias para sobrevivir la depredación viral (Labrie *et al.*, 2010).

Sistema CRISPR/Cas

Los mecanismos para evitar infecciones virales incluyen: prevención de la adsorción del fago, inhibición de la inyección del material genético viral, modificación y restricción del DNA viral y recientemente se ha demostrado la participación del sistema CRISPR (“clustered regularly interspaced short palindromic repeats”)/Cas (“DNA-targeting complex Cascade”) en la defensa contra fagos. Este “cluster” genético está presente en el 50% de los genomas de bacterias y en el 90% de genomas de arqueas (Kunin *et al.*, 2007); por lo tanto, se propone que este sistema antiviral representa un mecanismo muy antiguo dentro del mundo microbiano (Barrangou *et al.*, 2007), debido a ello, éste locus es utilizado como marcador molecular para definir genotipos en diversos organismos bacterianos (Schoultz *et al.*, 2007; Price *et al.*, 2007).

Los CRISPR/Cas están integrados por los siguientes elementos genéticos: una región reguladora encargada de controlar la transcripción de los genes *cas*, los cuales codifican proteínas con homología a nucleasas, helicasas, integrasas y polimerasas (Haft *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2006). Río abajo de los genes *cas* se ubica una secuencia no codificable rica en adeninas y timinas, denominada Líder (Jansen *et al.*, 2002). Finalmente, se localiza el “cluster” CRISPR, compuesto por secuencias palindrómicas repetidas (28-40 pb) separadas por

secuencias conocidas como espaciadores (26-72 pb), las cuales pueden tener homología con DNA exógeno, tal como DNA viral o plasmídico (Jansen *et al.*, 2002; Mojica *et al.*, 2000 y 2005) (Fig. 2).

Recientemente los CRISPR/Cas se clasificaron en tres tipos (Tipo I, II y III) (Makarova *et al.*, 2011). El Tipo I está representado en diversos microorganismos tales como *E. coli* y *Salmonella*. El mecanismo de acción de los CRISPR/Cas se ha descrito en tres etapas: adaptación, expresión e interferencia (Fig. 2).

Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas tipo I

▪ Etapa de Adaptación

Las poblaciones bacterianas al ser infectadas por bacteriófagos, generalmente son erradicadas en un 99%; sin embargo, una pequeña parte de la población sobrevive, adquiriendo inmunidad (inmunidad adquirida o adaptativa) al elemento invasor. La “inmunidad adquirida” se obtiene al incorporar una pequeña porción de DNA viral, en la región 3´ de la secuencia Líder, como un nuevo espaciador (Lillestøl *et al.*, 2006). Este nuevo espaciador integrado al genoma bacteriano es heredado a las generaciones descendientes y es indispensable para sobrevivir a futuras reinfecciones (Revisado en van der Oost *et al.*, 2009). Las proteínas Cas1 (integrasa/nucleasa) y Cas2 (endoribonucleasa) han sido involucradas en la adquisición del nuevo espaciador (Brouns *et al.*, 2008). Existen secuencias específicas en el material genético invasor denominadas PAMs (Motivo Adyacente al Protoespaciador), que flanquean el fragmento de DNA (protoespaciador) que será insertado como nuevo espaciador en las secuencias CRISPR. Los PAMs permiten discriminar el DNA invasor del endógeno (Marrafini y Sontheimer, 2010).

▪ Etapa de Expresión

Cuando la población bacteriana se encuentra nuevamente con el bacteriófago, el sistema CRISPR/Cas entra en etapa de expresión, generando las proteínas Cas: Cas3, CasA, CasB, CasC, CasD, CasE, Cas1 y Cas2 y un pre-crRNA proveniente de los CRISPR. El pre-crRNA contiene secuencias palindrómicas repetidas que son intercaladas por los espaciadores. Este RNA forma estructuras tipo tallo/asa, gracias a las secuencias repetidas. Esta es reconocida por el complejo CASCADA, formado por las proteínas CasABCDE, de las cuales CasE es la encargada de procesar el pre-crRNA para formar los crRNAs (Brouns *et al.*, 2008). Los crRNA se componen de una secuencia repetida palindrómica en el extremo 3´, una

secuencia espaciadora (homóloga al DNA viral) y una cola de nucleótidos de tamaño variable en el extremo 5' (Marraffini y Sontheimer, 2010; Kunin *et al.*, 2007).

▪ Interferencia

El complejo CASCADA permanece unido a los crRNAs, los cuales son capaces de alinearse con el material genético viral o plasmídico derivado de la reinfección. (Brouns *et al.*, 2008; Sorek *et al.*, 2008). La proteína Cas3, con dominios HD-nucleasa, reconoce estos complejos y degradan el genoma invasor proporcionando inmunidad bacteriana (Brouns *et al.*, 2008; Han y Krauss, 2009).

La funcionalidad de este mecanismo se ha demostrado en *Streptococcus thermophilus* (Barrangou *et al.*, 2007; Deveau *et al.*, 2008) y en *Escherichia coli* K12 (Brouns *et al.*, 2008). También se ha descrito que en *Staphylococcus epidermidis* el sistema CRISPR/Cas disminuye la adquisición de DNA movilizado por conjugación y transformación (Marraffini y Sontheimer, 2008).

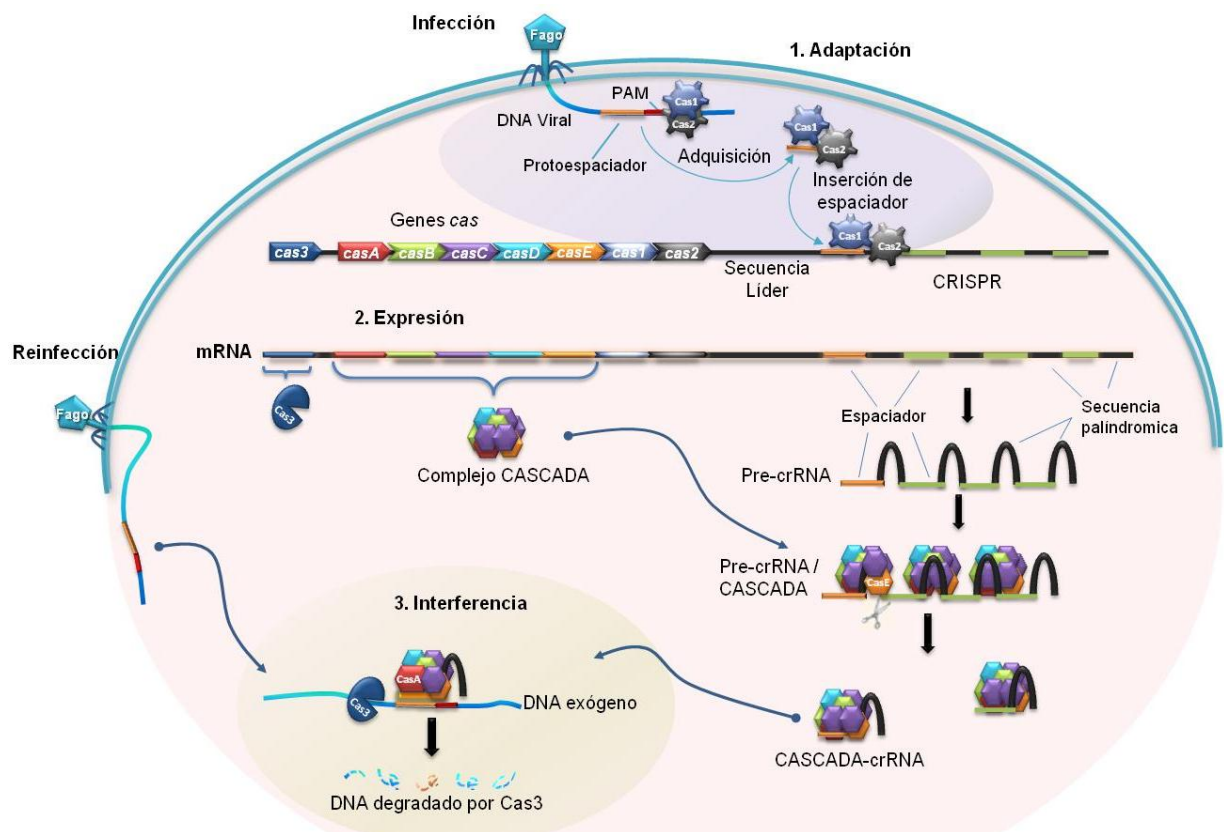


Fig. 2 Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas. Los genes *cas*, proteínas Cas, secuencias CRISPR y DNA viral se muestran en código de colores. **1. Adaptación.** El DNA viral inyectado a la célula bacteriana es reconocido a través del PAM (Rojo) por Cas1 y Cas2, posteriormente el protoespaciador (anaranjado) es insertado en la secuencia Líder como un nuevo espaciador de los CRISPR. **2. Expresión.** Ante una reinfección, el sistema CRISPR/Cas se transcribe, dando origen a Cas3, a las proteínas del complejo de cascada CasABCDE, a Cas1, Cas2 y un pre-crRNA formado por secuencias repetidas y los espaciadores. La CASCADA reconoce el pre-crRNA, CasE provoca un corte en el pre-crRNA liberando un crRNA que permanece unido a la CASCADA. **3. Interferencia.** CasA identifica el DNA invasor a través del PAM (marcado en rojo sobre el DNA viral). Posteriormente, el crRNA contenido en el espaciador, hibrida por complementariedad de bases con el DNA viral. Finalmente la CASCADA recluta a Cas3, proteína encargada de degradar el material genético invasor. De esta manera la bacteria resiste el ataque viral.

Además de la defensa contra elementos genéticos móviles, en diferentes microorganismos se han sugerido otras funciones biológicas para el “cluster” CRISPR/Cas, como la formación de biopelícula (Zagans, 2008); reparación de DNA, debido a que se ha observado que el sistema se expresa con radiación gamma (Williams *et al.*, 2007), estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno (Strand *et al.*, 2010) y daño por luz ultra violeta (Plagens *et al.*, 2012). Esto es lo que se conoce para el sistema CRISPR/Cas tipo I.

En años recientes se ha caracterizado el sistema CRISPR/Cas tipo II, el cual solo está presente en bacterias. Este locus se compone de *cas9*, *cas1*, *cas2*, *cas4*, un tracrRNA (RNA en *trans* de los CRISPR), una secuencia líder adyacente a los CRISPR (Fig. 3). Cas9 es una proteína con dos dominios de nucleasa, tipo RuvC y McrA. El tracrRNA se expresa independientemente del “cluster” CRISPR/Cas y tiene homología parcial con las secuencias repetidas de los CRISPR (Deltcheva *et al.*, 2011). Este mecanismo funciona de la siguiente manera. Después de la expresión del locus CRISPR/Cas, se sintetizan las proteínas Cas y se genera un pre-crRNA. En presencia de Cas9, se da el apareamiento, por complementariedad de bases, entre tracrRNA y pre-crRNA, estos duplex son reconocidos por una RNasa III, la cual corta el pre-crRNA, generando pequeños crRNAs unidos a los tracrRNAs y a Cas9. El duplex tracrRNA:crRNA es llamado RNA guía (gRNA), que unido a Cas9 hibrida con el DNA blanco. Posteriormente Cas9 genera un corte en la doble cadena del DNA invasor (Fig. 3). El reconocimiento del DNA blanco es dependiente de la presencia de secuencias PAM. Las proteínas Cas1, Cas2 y Cas4 están implicadas en la adquisición de nuevos espaciadores (Gilbert *et al.*, 2013; Cong *et al.*, 2013; Barrangou y Marraffini, 2014) (Fig. 3).

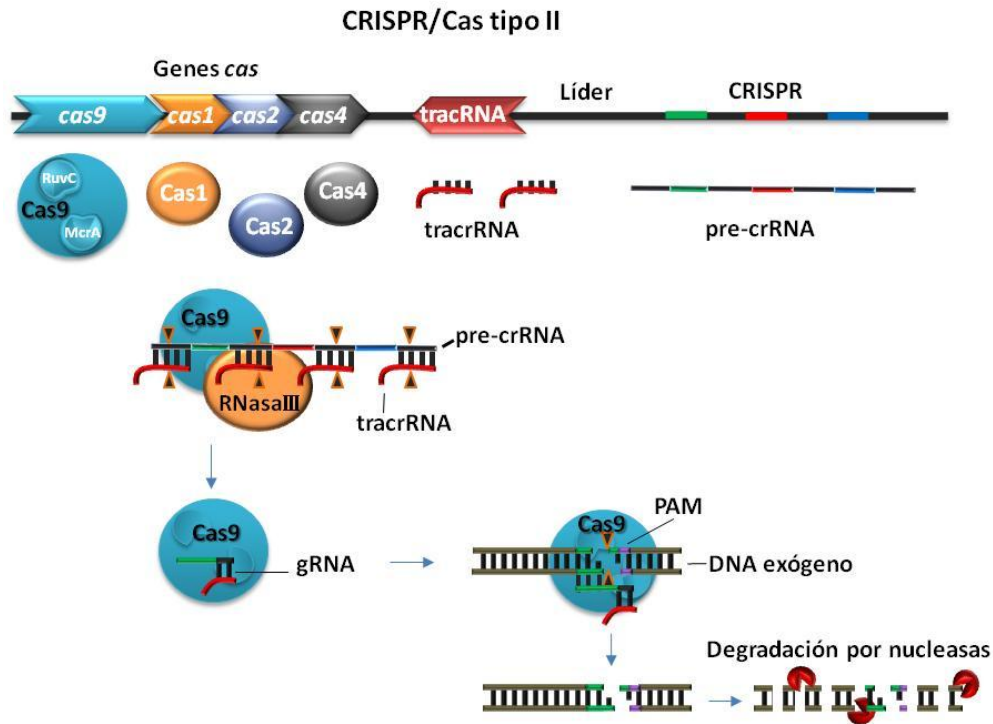


Fig. 3. organización genética y mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas tipo II. El sistema CRISPR/Cas se expresa dando origen a las proteínas Cas y un pre-crRNA, de manera independiente se expresa el *tracrRNA*. En presencia de Cas9, el pre-crRNA unido a un *tracrRNA* es procesado por una RNasa III, dando pauta a la formación del gRNA. La proteína Cas9 unida a un gRNA reconoce el DNA invasor y genera un corte en la doble cadena a través de sus dominios RuvC y McrA. Finalmente proteasas endógenas degradan el DNA invasor y la bacteria sobrevive al ataque viral.

Recientemente se demostró que el arreglo genético CRISPR/Cas tipo II, está implicado en diferentes procesos biológicos, por ejemplo: en *Neisseria meningitidis* disminuye la adquisición de DNA mediada por transformación (Zhang *et al.*, 2013). En *Francisella novicida* se describió la existencia de un “small RNA asociado a los CRISPR/Cas” (*scaRNA*) codificado en la secuencia líder, el complejo Cas9/*tracrRNA*:*scaRNA* promueve la degradación de un mRNA el cual codifica una lipoproteína antigénica involucrada en inducir la respuesta inmune, por lo tanto el patógeno puede infectar a su hospedero. Las mutantes en Cas9, *tracrRNA* o *scaRNA*, no son capaces de degradar el mRNA de la lipoproteína, por lo tanto ésta es reconocida por el sistema inmune y la bacteria es erradicada. Esto demuestra el papel en virulencia del sistema CRISPR/Cas (Jones *et al.*, 2012; Sampson *et al.*, 2013).

El estudio continuo de los diferentes tipos de CRISPR/Cas, ha permitido utilizar esta biotecnología para editar genomas, generando inserciones, deleciones y mutaciones puntuales

en sitios específicos, mediante un sistema CRISPR/Cas tipo II modificado, el cual es clonado en un plásmido y puede utilizarse en células procariontes y eucariontes. Este sistema se basa en la estructura básica del complejo Cas9/gRNA y se compone de la proteína Cas9 silvestre; un simple RNA guía (sgRNA) prediseñado, el cual contiene en el extremo 5' una secuencia de 19 a 23 nucleótidos con homología al DNA blanco (representa el crRNA), seguido de una secuencia PAM y una secuencia en el extremo 3' que forma una estructura tipo tallo/asa (Fig. 3). La proteína Cas9 es guiada a secuencias específicas de DNA, gracias al sgRNA, generando cortes de la doble cadena blanco. Sin embargo, tratándose de cortes sobre el DNA genómico, la célula actúa de manera diferente e incorpora su maquinaria celular para reparar el DNA afectado. La célula cuenta con dos mecanismos de reparación de DNA, uno de ellos es el sistema de reparación por "uniones de extremos no homólogos" (NHEJ) en el que participan enzimas como polimerasas, ligasas, nucleasas, girasas etc. Este sistema no requiere extremos compatibles (cohesivos o romos) en el DNA para religarlo, por lo cual, es frecuente que este mecanismo introduzca errores al actuar. Las deleciones suceden cuando las nucleasas rasuran lo extremos de DNA para ligarlos. Por otro lado, las inserciones son sintetizadas por polimerasas que se unen sobre los extremos del corte y rellenan los huecos polimerizando las cadenas de DNA con nucleótidos insertados de manera azarosa. En ambos casos, se puede afectar el marco de lectura de un gen, impidiendo la producción de una proteína específica. Se ha observado que las deleciones e inserciones generadas varían de uno a varios nucleótidos (Ansai y Kinoshit, 2014) (Fig. 4). El segundo mecanismos de reparación es mediante recombinación homóloga (HR) y actúa después de que el complejo Cas9/sgRNA corta de manera dirigida un sitio en el genoma. Este mecanismos requiere una cadena lineal homóloga al DNA donde ocurrió la modificación, esta cadena molde es integrada al genoma dando como resultado la reparación total del DNA. Sin embargo, cuando se proporciona de manera artificial, un molde de DNA conteniendo sustituciones puntuales, el sistema de recombinación homóloga incorpora de manera estable las mutaciones correspondientes (Fig. 4) (Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013; Gilbert *et al.*, 2013). El DNA templado editado se integra a la célula por electroporación.

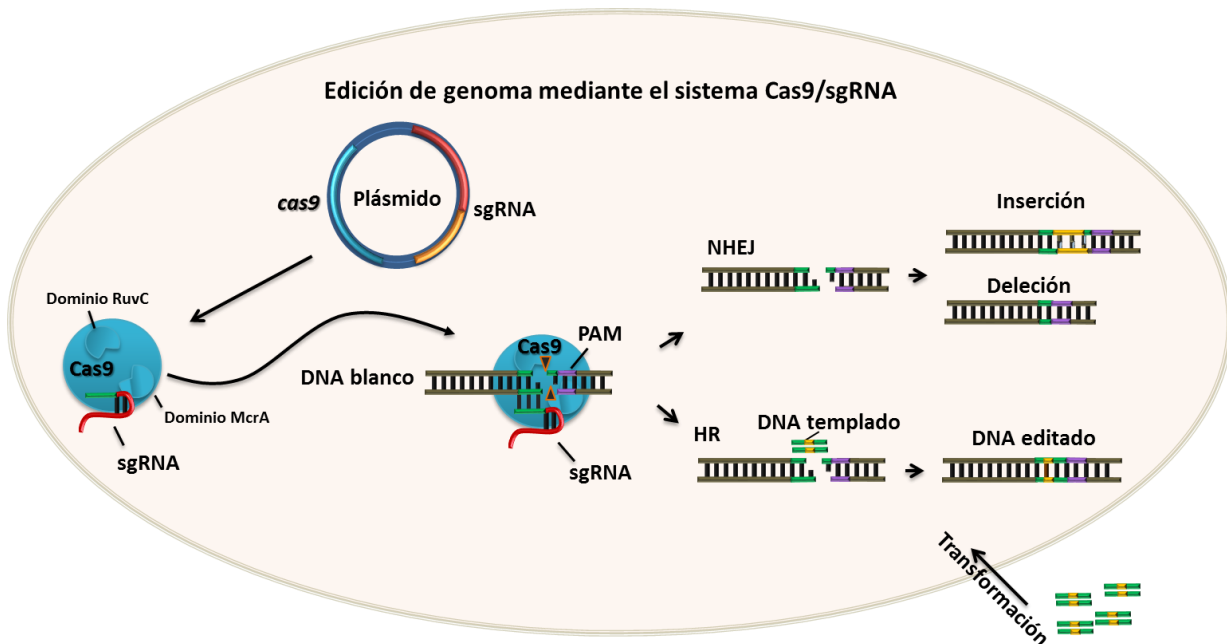


Fig. 4. Edición de DNA mediante un sistema artificial CRISPR/Cas tipo II. Mediante el sistema artificial Cas9/sgRNA, se pueden dirigir cortes en el DNA genómico. Estas rupturas del genoma pueden ser reparados por dos vías: El sistema de reparación por uniones de extremos no homólogos (NHEJ), no requiere extremos compatibles en el DNA para religarlo, por lo cual, es frecuente que este mecanismo introduzca errores, tales como deleciones e inserciones en el sitio de unión. Las alteraciones en el DNA puede ser reparada mediante recombinación homóloga (HR) en presencia de una doble cadena de DNA (dsDNA) homóloga al sitio afectado, este DNA se integrará al genoma, dando como resultado un DNA idéntico al original. Es posible generar mutaciones específicas en el genoma al proveer un dsDNA molde conteniendo sustituciones puntuales (Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013).

Esta biotecnología ha tenido aplicaciones en células eucariontes. En la planta de arroz y en *Plasmodium yoelii* (agente causal de la malaria), se han realizado mutaciones específicas, estables y heredables (Zhang *et al.*, 2014¹; 2014²); en pez cebra (*Danio rerio*) se cambió el fenotipo de pigmentación en piel a través de mutaciones inducidas (Ota *et al.*, 2014); se ha logrado conferir resistencia a drogas en células de mamífero (Smurnyy *et al.*, 20014, Kasap *et al.*, 2014), revertir células cancerosas y diseñar modelos animales humanizados para el estudio de enfermedades genéticas (Yang *et al.*, 2014; Veres *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2014).

Este sistema también puede servir para modular transcripcionalmente la expresión de genes específicos, esto se logra mediante la utilización de una proteína Cas9 inactivada en sus dominios de nucleasa (dCas9) conservando solo su capacidad de unión a DNA, dCas9 es guiada por un sgRNA a promotores de genes específicos, el complejo reconoce y permanece

unido a su DNA blanco bloqueando la entrada de la RNA polimerasa o impidiendo su elongación cuando el complejo está unido río abajo del promotor (Fig. 5).

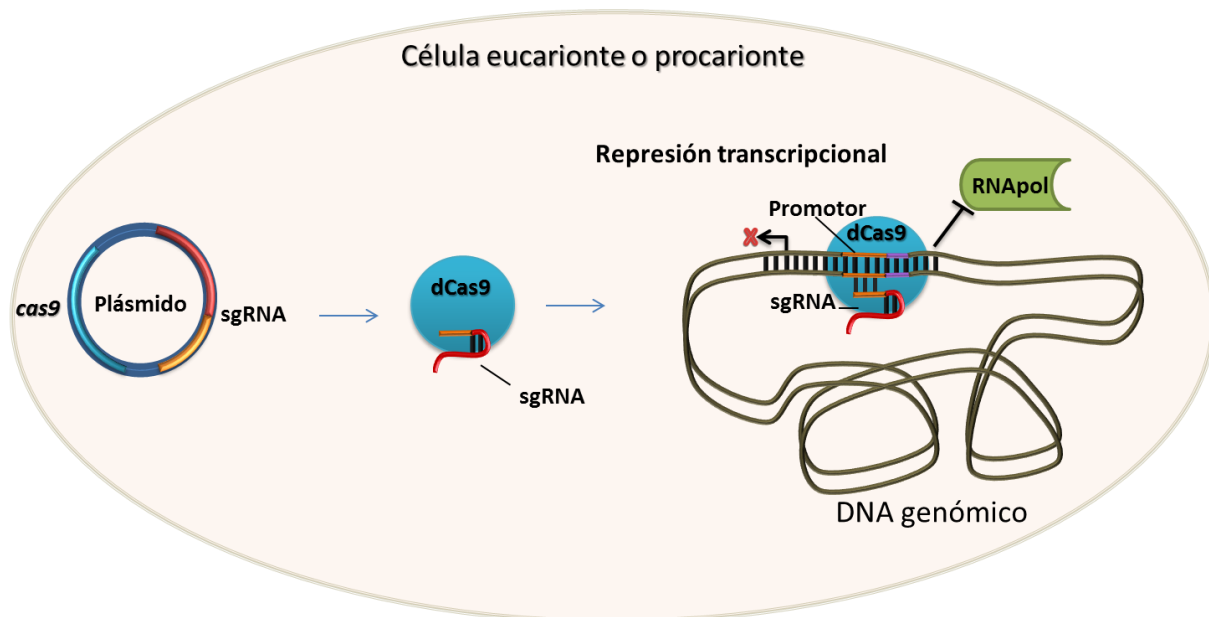


Fig. 5. Aplicaciones del sistema CRISPR/Cas tipo II. dCas9 (Cas9 sin actividad de nucleasa) en conjunto con un sgRNA, reprimen la transcripción impidiendo el reconocimiento de la RNA polimerasa a su promotor. También impide la elongación de la RNAP cuando se dirige su unión río abajo de un promotor (Bikard *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2013).

ANTECEDENTES

Sistema CRISPR/Cas en *S. Typhi*

S. Typhi es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la rama γ de las proteobacterias y forma parte de la familia enterobacteriaceae. *S. Typhi* es el agente causal de la tifoidea, enfermedad sistémica y febril que afecta únicamente al ser humano (Sánchez-Martínez *et al.*, 2002).

En nuestro grupo de trabajo, reportamos que *S. Typhi* IMSS-1 contiene un locus CRISPR/Cas Tipo I; constituido por una región reguladora 5' de 356 pares de bases (pb), ocho genes *cas*: *cas3*, *casA-casB-casC-casD-casE-cas1-cas2* (Medina-Aparicio *et al.*, 2011), una secuencia líder de 84 pb, siete secuencias repetidas de 29 pb y seis espaciadores de 32 pb (Fig. 6).

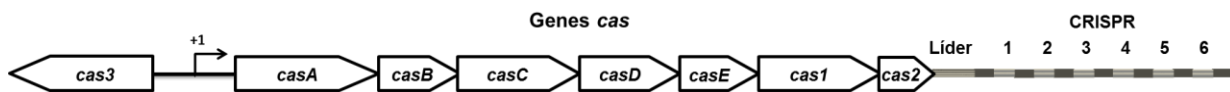


Fig. 6. Organización genética del sistema CRISPR/Cas en *S. Typhi* IMSS-1. El inicio de transcripción (+1) se ubica a -94 pb respecto al ATG de *casA*. En barras grises se representan las secuencias palíndromas repetidas; se enumeran los espaciadores contenidos en el “cluster”.

Análisis bioinformáticos de los espaciadores contenidos en las secuencias CRISPR de *S. Typhi* IMSS-1, no han mostrado homología con los genomas virales reportados hasta el momento; sin embargo, algunos espaciadores han presentado similitud con genomas de procariontes y eucariontes, algunos de ellos patógenos de humano. Un estudio reciente reportó en *S. enterica sub. enterica*, espaciadores con homología a DNA viral y plasmídico (Touchon y Rocha, 2010). Estos espaciadores sugieren eventos de interacciones bacteria-elemento genético móvil, sin embargo en *S. Typhi* no se ha demostrado la funcionalidad del sistema CRISPR/Cas.

Estudios transcripcionales realizados en nuestro laboratorio, han revelado que el “cluster” CRISPR/Cas forma un operón dependiente de LeuO, adicionalmente, hemos demostrado represión transcripcional mediada por los reguladores H-NS (Histone-like Nucleoid-Structuring) y LRP (leucine response protein), los cuales se unen río arriba y río abajo del inicio de transcripción del primer gen del operón *casA* (Hernández-Lucas *et al.*, 2008; Medina-Aparicio *et al.*, 2011).

Existen ambientes relacionados con la etapa de infección de *S. Typhi*, en los cuales se ha observado la actividad de los CRISPR/Cas p. ej. La expresión de *casC* (tercer componente del “cluster” CRISPR/Cas de *S. Typhi*) se detectó en macrófagos de humano (Fautcher *et al.*, 2005), por esta razón evaluamos la expresión del primer componente del “cluster”, *casA*, en medio mínimo-N (MM-N); este medio de cultivo simula el ambiente intracelular de macrófagos humanos (Deiwick *et al.*, 1999); los resultados demuestran que *casA* se expresa en MM-N independientemente del regulador transcripcional LeuO; los reguladores globales H-NS y LRP conservan su actividad represora en esta condición. Además, por medio de fusiones transcripcionales, determinamos que *casB*, segundo componente del operón CRISPR/Cas de *S. Typhi*, se expresa en MM-N. Este resultado sugiere la presencia de diversas unidades transcripcionales del locus CRISPR/Cas en MM-N y que pueden existir múltiples reguladores y señales involucradas en la expresión del conjunto genético CRISPR/Cas en *S. Typhi* en MM-N (Medina-Aparicio *et al.*, 2011). Es relevante determinar si el “cluster” CRISPR/Cas se comporta como un operón o genera diferentes transcritos, así como identificar las señales y los reguladores transcripcionales que inducen el “cluster” CRISPR/Cas en MM-N.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han realizado múltiples investigaciones para entender el mecanismo de defensa CRISPR/Cas. Sin embargo, existe un número limitado de reportes sobre la etapa de expresión y regulación transcripcional de este sistema inmune en procariontes.

En *S. Typhi*, nuestro grupo de investigación ha demostrado el papel funcional de LeuO, H-NS y LRP en el control transcripcional del operón CRISPR/Cas. También hemos determinado, por medio de fusiones transcripcionales, la expresión de *casA* y *casB* en MM-N; sin embargo, se desconocen las señales y elementos genéticos que inducen la expresión de estos genes en la condición antes mencionada.

OBJETIVO GENERAL

Identificar las señales y los elementos genéticos que regulan la expresión del conjunto de genes CRISPR/Cas en *S. Typhi* en medio mínimo-N.

OBJETIVOS PARTICULARES

- **Definir las unidades transcripcionales del locus CRISPR/Cas en MM-N.**
- **Determinar los elementos genéticos o nutricionales que controlan positivamente la expresión de del sistema CRISPR/Cas.**
- **Caracterizar nuevas regiones reguladoras del sistema CRISPR/Cas.**
- **Establecer el mecanismo de regulación del sistema CRISPR/Cas en MM-N.**

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Los medios de cultivo utilizados fueron: LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%, pH 7.5), medio mínimo-N (MM-N) [KCl 5 mM, (NH₄)₂SO₄ 7.5 mM, K₂SO₄ 0.5 mM, KH₂PO₄ 1 mM, Tris-HCl (pH 7.5) 100 mM o 200 mM, MgCl₂ 200 μM, glicerol 0.5% y casaminoácidos 1%] (Deiwick *et al.*, 1999), MA (7 g de caldo nutritivo, 1 g de extracto de levadura, 2 ml de glicerol, 3.75 g de K₂HPO₄ y 1.3 g de KH₂PO₄ por litro) (Kawaji *et al.*, 1979), SOB (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, KCl 2.5 mM y MgCl₂ 10 mM y NaCl 0.05%) y SOC (medio SOB suplementado con glucosa 20 mM). Para preparar medio sólido se utilizó agar al 1.5%.

Cuando fue necesario, los medios se suplementaron con kanamicina (Km), 30 μg ml⁻¹; tetraciclina (Tc), 12 μg ml⁻¹; cloranfenicol (Cm), 34 μg ml⁻¹; ampicilina (Ap), 200 μg ml⁻¹ y carbenicilina (Cb), 250 μg ml⁻¹, diferentes concentraciones de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido), X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) y L-arabinosa (Ara).

En medio sólido las cepas fueron cultivadas a 37°C y en medio líquido se incubaron a 37°C en agitación (200 rpm).

Manipulación de DNA

El DNA cromosómico de las cepas se aisló mediante el estuche comercial “Promega, Madison”. El diseño de oligonucleótidos se realizó con el programa OLIGO 6 y fueron generados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM. Las reacciones de PCR se amplificaron en el termociclador GeneAmp PCR system 9 700 (Roche Applied Biosystems), las enzimas de restricción, ligasas, polimerasas y nucleótidos, se obtuvieron de las compañías New England Biolabs y Gibco BRL. Los plásmidos y productos de PCR fueron purificados con “High Pure Plasmid Isolation Kit” y “High Pure PCR Purification Kit” (Roche Applied Science, Germany) respectivamente. Las muestras de DNA fueron secuenciadas con el sistema Perkin Elmer/Applied Biosystems 377-18.

Construcción de fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*

Las fusiones transcripcionales se construyeron amplificando mediante PCR las regiones de interés (promotores), se usaron los oligonucleótidos correspondientes (Tabla 4) y DNA genómico de *S. Typhi* IMSS-1 como templado. Los productos de PCR fueron digeridos con diferentes enzimas de restricción promoviendo direccionalidad, estos fragmentos fueron ligados en el plásmido pKK232-8, con resistencia a ampicilina (Pharmacia LKB Biotechnology, Fig. 7) o pKK232-9, con un casete de resistencia a kanamicina (Hernández-Lucas *et al.*, 2008), ambos vectores poseen el gen reportero *cat* (cloranfenicol acetil transferasa) (Fig.7). También se utilizó el plásmido pRS415 para realizar fusiones transcripcionales con el gen reportero el *lacZ*.

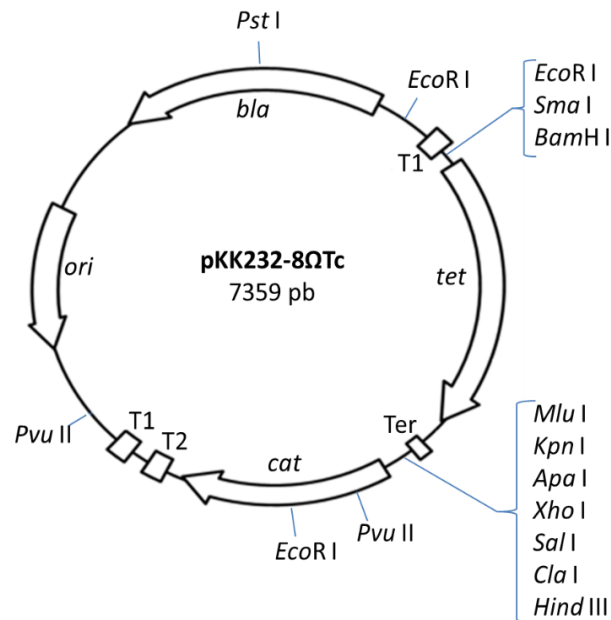


Fig. 7. Mapa genético del vector pKK232-8. El plásmido posee el gen reportero *cat*; un origen de replicación derivado del pBR322; los casetes de resistencia a ampicilina (*bla*) y tetraciclina (*tet*); terminadores de la transcripción del gen *rrnB*: T1, T2 y *rrnB*_Ter; sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (“polylinker”) indicadas en corchetes.

Las fusiones construidas se transformaron a *E. coli* DH5α quimiocompetentes mediante choque térmico. Las clonas fueron seleccionadas con Ap o Km según el plásmido utilizado, posteriormente se realizó PCR con oligos específicos, se aislaron los plásmidos y finalmente, mediante secuencia de DNA, se confirmaron los fragmentos clonados. Los plásmidos seleccionados se electroporaron en cepas de *S. Typhi* IMSS-1 y determinamos su expresión mediante ensayos de actividad transcripcional. Para realizar fusiones traduccionales se utilizó

el plásmido pMC1871. Los plásmidos pQE60 (QUIAGEN) y pMPM-T6Ω (Mayer, 1995) fueron utilizados para sobreexpresar los elementos genéticos de interés.

Ensayos de expresión de las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*

Las cepas a evaluar se sembraron en medio de selección y se incubaron 18-24 h a 37°C. Posteriormente se inoculó una colonia aislada en 7 ml de MM-N o 7 ml de LB y se incubó 16-24 horas en agitación a 37°C.

Tres mililitros de cultivo fueron centrifugados en tubos eppendorf por 5 min a 7'000 rpm, para obtener la pastilla celular, posteriormente fue lavada con 1 ml de MM-N y resuspendida (con micropipeta) en 500 µl de MM-N. Este volumen fue inoculado en un matraz de 250 ml conteniendo 50 ml de medio de cultivo MM-N y se incubaron a 37°C a 200 rpm durante 16 h. A partir de estos ensayos se tomaron 1.5 ml para O.D.₅₉₅ de 0.4, 0.6 y 0.8; 1 ml para O.D. ₅₉₅ de 1.0; y 0.6 ml para una O.D. ₅₉₅ ≥1.2.

Las muestras se centrifugaron 2 minutos a 13000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular fue lavada con 800 µl de TDTT (Tris-HCl 50 mM pH 7.8, ditioneitol (DTT) 30 µM). Las pastillas se resuspendieron en 600 µl de TDTT, posteriormente se sonicaron 3 minutos en el sonicador Vibra Cell (Sonics and Materials, Inc.) con pulsos de 9.9 segundos encendido y 9.9 segundos de reposos. Finalmente las muestras sonicadas se centrifugaron 15 min a 12 000 rpm y el sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf.

Las proteínas totales se cuantificaron colocando 10 µl de cada extracto, por duplicado, en placas ELISA de 96 pozos (costar), agregando 200 µl de una mezcla de reacción del estuche BCA Protein Assay Reagent (Pierce). Las placas se incubaron durante 30 min a 37°C y se determinó la concentración de proteínas a una absorbancia de 562 nm en un lector Ceres 900-C (Bio-Tek Instruments Inc.) utilizando el programa KC4.

La actividad enzimática CAT se determinó colocando, por duplicado, 5 µl de cada extracto en placas ELISA de 96 pozos, añadiendo 200 µl de la solución: DTNB 1mM [ácido 5,5'ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico)], acetil-coenzima A 0.1 mM y cloranfenicol 0.1 mM en Tris-HCl, pH 7.8 0.1 M. Posteriormente se determinó la actividad CAT, a una absorbancia de 412 nm, en lector Ceres con intervalos de 5 segundos durante 5 minutos. La actividad específica CAT (µmol/min/mg proteína) se obtuvo al dividir las unidades CAT entre la concentración de proteínas totales de cada muestra.

Construcción de cepas mutantes

La mutagénesis se realizó empleando la técnica descrita por Datsenko y Wanner, 2000, la cual consiste en reemplazar la secuencia genómica de interés por un casete de resistencia a Km. Para ello, se genera un PCR que contiene: una secuencia homóloga a la región 5' del gen blanco, secuencia FRT, el casete Km, secuencia FRT y finalmente la secuencia homóloga a la región 3' del gen blanco. Este PCR se sintetiza utilizando como templado el plásmido pKD4, el cual contiene los sitios FRT adyacentes al casete de resistencia a Km. El PCR es transformado a la cepa que se desea mutagenizar. Para la recombinación homóloga, es necesaria la recombinasa del fago λ Red, contenida en el plásmido pKD46, el cual es previamente transformado a la cepa de trabajo. El gen de resistencia a Km insertado en la cepa manipulada puede ser eliminado con el plásmido pCP20, el cual expresa la recombinasa FLP, esta reconoce secuencias directas repetidas FRT que flanquean el gen de resistencia Km y genera la recombinación entre estos sitios, de ésta manera es removido el casete de Km del genoma bacteriano, el pCP20 tiene un origen de replicación sensible a 42°C, por lo tanto es eliminado al incubar la cepa bacteriana en esta temperatura. Las cepas mutantes se verificaron mediante PCR y secuenciación.

Electroforesis de proteínas.

Cepas de *S. Typhi* fueron crecidas en 5 ml de LB con antibiótico (Ap²⁰⁰, Tc⁶) e IPTG (inductor para el promotor del pQE60) o Ara (inductor para promotor del pMPMT6). Se tomaron los 5 ml, se centrifugaron y lavaron con 1 ml de DTT, las pastillas (conteniendo las proteínas de interés) se resuspendieron en 500 μ l de Na₂HPO₄, pH 7.2 10 mM mezclando con vortex y las muestras se sonicaron hasta clarificarse. Posteriormente fueron centrifugadas a 12 000 rpm durante 20 min y temperatura ambiente. Finalmente el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos.

Las proteínas totales se cuantificaron con el estuche BCA Protein Assay Reagent y se tomaron 15 μ g de proteínas para ser analizadas en geles electroforeticos de poliacrilamida 12%, SDS (12% PAGE). Los geles se sometieron a electroforesis a un voltaje de 10 mA durante 23 horas. Para visualizar las proteínas los geles fueron teñidos con azul de coomassie.

RT-PCR

Los RT-PCR (Reverse transcription-PCR) se realizaron de acuerdo a Gallego-Hernández *et al.*, 2012. EL RNA total se extrajo con fenol ácido a partir de 20 ml de cultivo bacteriano crecido en 50 ml de MM-N a una O. D.₅₉₅ ≥ 1.2 . La concentración de RNA total fue determinada midiendo absorbancia a 260 nm en nanodrop y la integridad del mismo fue verificada por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. 20 μg de RNA fueron tratados con DNasa I (Fermentas), para la síntesis de cDNA se utilizó 1 μg de RNA (libre de DNA) y oligos específicos, siguiendo las indicaciones del estuche comercial “Revert-Aid H-Minus First Strand cDNA Synthesis Kit Protocol” (Fermentas). El cDNA obtenido fue utilizado como templado para sintetizar PCRs correspondientes a los elementos genéticos expresados. Finalmente, estos productos fueron analizados en geles de agarosa.

“Primer extension”

Se obtuvieron 40 μg de RNA total a partir de la cepa de estudio, este RNA se mezcló con un oligonucleótido específico marcado radioactivamente con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP el cual hibridara con el mRNA que se desea estudiar. La mezcla se desnaturalizó a 95°C por 3 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron dNTP's, buffer y la enzima Reversa transcriptasa para amplificar cDNA, siguiendo la recomendaciones del estuche comercial “Revert-Aid H-Minus First Strand cDNA Synthesis kit protocol” (Fermentas). Los productos extendidos fueron purificados por precipitación con N-butanol y analizados por electroforesis en geles de secuencia (poliacrilamida 8%, urea 8M). La secuencia tipo Sanger se sintetizó utilizando como templado el plásmido de interés y oligonucleótido marcado radioactivamente con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP.

Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas y plásmidos empleados en el presente trabajo se enlistan en la tabla 1 y 2 respectivamente.

Tabla 1. Cepas bacterianas.

Cepa	Descripción	Referencia
IMSS-1	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi IMSS-1 (<i>S. Typhi</i>), cepa aislada de paciente mexicano.	Puente <i>et al.</i> , 1987
IMSS-1-pKK-PcasA-375/+191	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -375/+191 respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , fusionada al plásmido pKK232-8.	Medina-Aparicio <i>et al.</i> , 2011
IMSS-1 pKK-casA-9/+191	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -9/+191 respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> (no incluye el promotor <i>PcasA</i>), fusionada al plásmido pKK232-8.	Este trabajo
IMSS-1 pKK-PcasB-450/+181	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -450/+181 respecto al ATG de <i>casB</i> fusionada al plásmido pKK232-8.	Este trabajo
IMSS-1 pKK-casC-470/+132	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -470/+132 respecto al ATG de <i>casC</i> fusionada al plásmido pKK232-8, Ap ^R .	Este trabajo
IMSS-1 pKK-casD-952/+279	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -952/+279 respecto al ATG de <i>casD</i> , fusionada al plásmido pKK232-8, Ap ^R .	Este trabajo
IMSS-1 pKK-casE-472/+235	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -472/+235 respecto al ATG de <i>casE</i> , fusionada al plásmido pKK232-8, Ap ^R .	Este trabajo
IMSS-1 pKK-casE-291/+6	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -291/+6 respecto al ATG de <i>casE</i> , fusionada al plásmido pKK232-8, Ap ^R .	Este trabajo
IMSS-1 pKK-casI-488/+600	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -488/+600 respecto al ATG de <i>casI</i> fusionada al plásmido pKK232-8, Ap ^R .	Este trabajo
IMSS-1 pKK-casI-195/+6	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -195/+6 respecto al ATG de <i>casI</i> fusionada al plásmido pKK232-8, Ap ^R .	Este trabajo
IMSS-1 pKK-cas2-64/+213	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -64/+213 respecto al ATG de <i>cas2</i> fusionada al plásmido pKK232-8, Ap ^R .	Este trabajo
IMSS-1 pKK-cas2-84/+6	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -84/+6 respecto al ATG de <i>cas2</i> fusionada al plásmido pKK232-8, Ap ^R .	Este trabajo
IMSS-1 pKK-PcasA-cas2 (-347/+5808)	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -347/+5808 pb respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , este fragmento incluye el promotor de <i>casA</i> y los genes <i>casABCDEI2</i> , fusionada al plásmido pKK232-9, Km ^R .	Este trabajo
IMSS-1 pKK-PcasA-CRISPR (-347/+6382)	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -347/+6382 respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , este fragmento incluye: 5' el promotor de <i>casA</i> , los genes <i>casABCDEI2</i> y las secuencias CRISPR 3', fusionado al gen reportero <i>cat</i> en el plásmido pKK232-9, Km ^R .	Este trabajo
IM SS-1 pKKcasB-199/+181	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -199/+181 respecto al ATG de <i>casB</i> fusionada al plásmido pKK232-8.	Este trabajo

IMSS-1 pKK <i>casB</i> -142/+181	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -142/+181 respecto al ATG de <i>casB</i> , fusionada al plásmido pKK232-8.	Este trabajo
IMSS-1 pKK <i>casB</i> -102/+181	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -102/+181 respecto al ATG de <i>casB</i> , fusionada al plásmido pKK232-8.	Este trabajo
IMSS-1 pKK <i>casB</i> -62/+181	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -62/+181 respecto al ATG de <i>casB</i> , fusionada al plásmido pKK232-8.	Este trabajo
IMSS-1 pKK <i>casB</i> -7/+181	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -7/+181 respecto al ATG de <i>casB</i> , fusionada al plásmido pKK232-8.	Este trabajo
IMSS-1 pKK <i>casB</i> +32/+181	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región +32/+181 respecto al ATG de <i>casB</i> , fusionada al plásmido pKK232-8.	Este trabajo
IMSS-1 pKK <i>casB</i> +111/+181	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región +111/+181 respecto al ATG de <i>casB</i> , fusionada al plásmido pKK232-8.	Este trabajo
IMSS-1 pKK <i>casB</i> +134/+181	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región +134/+181 respecto al ATG de <i>casB</i> , fusionada al plásmido pKK232-8, Ap ^R .	Este trabajo
IMSS-1 pKK- <i>PcasB</i> +142/+181	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región +142/+181 respecto al ATG de <i>casB</i> , fusionada al plásmido pKK232-8, Ap ^R .	Este trabajo
IMSS-1 pKK <i>casB</i> +142/+202,	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región +142/+202 respecto al ATG de <i>casB</i> , fusionada al plásmido pKK232-8, Ap ^R .	Este trabajo
IMSS-1 pKK <i>casB</i> +142/+222	<i>S. Typhi</i> IMSS-1 conteniendo la región +142/+222 respecto al ATG de <i>casB</i> , fusionada al plásmido pKK232-8, Ap ^R .	Este trabajo
IMSS-1 pKK <i>casB</i> +142/+267	<i>S. Typhi</i> IMSS-1 conteniendo la región +142/+267 respecto al ATG de <i>casB</i> , fusionada al plásmido pKK232-8, Ap ^R .	Este trabajo
IMSS-1 pKK <i>casB</i> -450/+181: Δ <i>arcA</i> , Δ <i>cpxR</i> , Δ <i>fnr</i> , Δ <i>phoP</i> , Δ <i>ssrB</i> , Δ <i>pmrAB</i> , Δ <i>narP</i> , Δ <i>hns/lrp</i> , Δ <i>malT</i> , Δ <i>pcnB</i> , Δ <i>himA</i> , Δ <i>ompR</i> , Δ <i>casA</i> -CRISPR, Δ STY0036, Δ STY0651, Δ STY3293, Δ STY0159, Δ STY0341, Δ STY0730, Δ STY3158, STY3415, Δ STY4126, Δ STY4468.	<i>S. Typhi</i> IMSS-1 con deleciones individuales en cada gen enlistado, conteniendo la región -450/+181 respecto al ATG de <i>casB</i> , fusionado al plásmido pKK232-8, Ap ^R .	Este trabajo
IMSS-1 pKK <i>casA</i> -51/+1149	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo el 5'-promotor de <i>casA</i> y 1056 nucleótidos de la región codificante de <i>casA</i> -3'. Coordenadas del -51/+1149 respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , fusionada al plásmido pKK232-8.	Este trabajo
IMSS-1 pKK <i>casA</i> -51/ <i>casB</i> +134	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo el 5'-promotor y gen de <i>casA</i> , más 134 pb del gen <i>casB</i> -3. Coordenadas -51/+1779 respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , fusionada al plásmido pKK232-8.	Este trabajo
IMSS-1 pKK <i>casA</i> -51/ <i>casB</i> +181	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, conteniendo la región -51/+1827 respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , que incluye el 5'-promotor y gen de <i>casA</i> , más 181 pb del gen <i>casB</i> -3', fusionada al plásmido pKK232-8.fusionada al plásmido pKK232-8.	Este trabajo
IMSS-1 Δ <i>casA</i> -CRISPR-pKK <i>casA</i> -51/+1149	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, Δ <i>casA</i> -CRISPR, conteniendo el 5'-promotor de <i>casA</i> y 1056 nucleótidos de la región codificante de <i>casA</i> -3'. Coordenadas del -51/+1149 respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , fusionada al plásmido pKK232-8.	Este trabajo

IMSS-1 $\Delta casA$ -CRISPR-pKK <i>casA</i> -51/ <i>casB</i> +134	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, $\Delta casA$ -CRISPR, conteniendo la región -51/+1779 respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , que incluye el 5'-promotor y gen de <i>casA</i> , más 134 pb del gen <i>casB</i> -3', fusionada al plásmido pKK232-8.	Este trabajo
IMSS-1 $\Delta casA$ -CRISPR-pKK <i>casA</i> -51/ <i>casB</i> +181	<i>S. Typhi</i> IMSS-1, $\Delta casA$ -CRISPR, conteniendo la región -51/+1827 respecto al inicio de transcripción de <i>casA</i> , que incluye el 5'-promotor y gen de <i>casA</i> , más 181 pb del gen <i>casB</i> -3', fusionada al plásmido pKK232-8.fusionada al plásmido pKK232-8.	Este trabajo
IMSS-1 $\Delta ompR$	IMSS-1 $\Delta ompR$	Villarreal <i>et al.</i> , 2014
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)		
<i>E. coli</i> M15	<i>E. coli</i> M15 [pREP4:: Km ^R], derivada de <i>E. coli</i> K12 Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ .	QUIAGEN
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> Φ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1endA1</i> <i>hsdR17</i> (rk-mk+) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> ; Nal ^F	Gibco BRL
M15 pQE60:: <i>casB</i>	<i>E. coli</i> M15, conteniendo el gen <i>casB</i> de <i>S. Typhi</i> fusionado traduccionalmente a pQE60.	Este trabajo

Tabla 2. Plásmidos

Plásmido	Descripción	Referencia
pKK232-8	Derivado de pBR322 conteniendo el gen reportero cloranfenicol acetil transferasa (<i>cat</i>) sin promotor; Ap ^R . Utilizado para realizar fusiones transcripcionales.	Pharmacia LKB Biotechnology
pKK232-9	Derivado de pKK232-8; Km ^R .	Hernández-Lucas <i>et al.</i> , 2008
pQE60	Derivado de pBR322, conteniendo un promotor inducible por IPTG; Ap ^R . Utilizado para sobreexpresar genes bajo el control del promotor <i>lac</i> .	QUIAGEN
pMPM-T6Ω	Vector derivado de pBlueScript (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Tc ^R , <i>ori</i> P15A. Utilizado para sobreexpresar genes bajo el control del promotor AraC.	Mayer, 1995.
pRS415	Polylinker de pBlueScript, LEU2, CEN6, ARSH4, Ap ^R , reportero <i>lacZ</i> . Utilizado para realizar fusiones transcripcionales.	Sikorski y Hieter, 1989
pBSL118	Derivado de pBlueScriptII, γ - <i>ori</i> R6K, gen de transposasa <i>Tn10</i> fusionado al promotor <i>Ptac</i> , y <i>lacI^s</i> , mini- <i>Tn10</i> Cm ^R . Utilizado para realizar mutagénesis al azar mediada por el sistema de transposición <i>Tn10</i> .	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
pKD46	Sistema de recombinasa λ RED bajo el control del promotor AraC, inducible por arabinosa, Ap ^R . Utilizado para inducir una alta tasa de recombinación.	Datsenko y Wanner, 2000
pKD4	Vector derivado de pANTS γ , conteniendo secuencias FRT adyacentes al gen de resistencia Km. Utilizado como templado para amplificar por PCR el casete de Km flanqueado por los FRT.	Datsenko y Wanner, 2000

Tabla 3. Antibióticos utilizados en este trabajo

Antibiótico	Concentración $\mu\text{g ml}^{-1}$
Carbenicilina (Cb)	250
Ampicilina (Ap)	200
Cloranfenicol (Cm)	34/20
Kanamicina (Km)	30
Estreptomina (St)	100
Tetraciclina (Tc)	12

Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este trabajo. En algunos casos se indica con la letra “**B**” el sitio de restricción *Bam*HI y con “**K**” el sitio *Kpn*I; la letra “**F**” señala un oligonucleótido idéntico a la hebra codificante del gen indicado, la letra “**R**” refiere el oligonucleótido idéntico a la hebra complementaria del gen en estudio.

Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Descripción
STY3069- R - <i>Bam</i> HI (<i>casB</i> +181/-162)	<u>CGG GAT CCA</u> TAT CAT TAC GCC ATA TGG C	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i>
STY3069- F - <i>Bam</i> HI (<i>casB</i> -450/-469)	<u>CGG GAT CCT</u> TCC GCT CAT TAG CGT TTC G	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i>
STY3069 <i>Kpn</i> I- R (<i>casB</i> +181/+162)	<u>GGG GTA CCA</u> TAT CAT TAC GCC ATA TGG C	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i>
<i>casB</i> 1° <i>Bam</i> HI- F (<i>casB</i> -62/-43)	<u>CGG GAT CCT</u> CGT AAA CAT AAA GCG CGC A	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i>
<i>casB</i> 3° <i>Bam</i> HI- F (-142/-127)	<u>CGG GAT CCG</u> TGA TGC CCT GAC CAA CC	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i>
<i>casB</i> +134/+181 B/K F	<u>GAT CCG</u> CGG GCT GAG TTG AAA AGA ATG GCG CCG CCA TAT GGC GTA ATG ATA TGG TAC	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i> , sitios de restricción 5' <i>Bam</i> HI y 3' <i>Kpn</i> I
<i>casB</i> +134/+181 B/K R	<u>CAT ATC ATT ACG CCA TAT GGC GGC</u> GCC ATT CTT TTC AAC TCA GCC CGC G	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i>
<i>casB</i> +142/+181 B/K F	<u>GAT CCA</u> GTT GAA AAG AAT GGC GCC GCC ATA TGG CGT AAT GAT ATG GTA C	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i> , sitios de restricción 5' <i>Bam</i> HI y 3' <i>Kpn</i> I
<i>casB</i> +142/+181 B/K R	<u>CAT ATC ATT ACG CCA TAT GGC GGC</u> GCC ATT CTT TTC AAC TG	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i>
<i>casB</i> +222/+302- R duplx B/K	<u>CAT GTT TAA GCA GAG CCT GGC GGA</u> GAG CGT CAT GTC CTT CAC ATA TCA TTA CGC CAT ATG GCG GCG CCA TTC TTT TCA ACT G	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i>
<i>casB</i> +222/+302- F duplx B/K	<u>GAT CCA</u> GTT GAA AAG AAT GGC GCC GCC ATA TGG CGT AAT GAT ATG TGA AGG ACA TGA CGC TCT CCG CCA GGC TCT GCT TAA ACA TGG TAC	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i> , sitios de restricción 5' <i>Bam</i> HI y 3' <i>Kpn</i> I

<i>casB</i> +267/+247 <i>KpnI</i> - R	<u>GGG GTA CCG</u> ACA AAC AGA GCC AGA GCC AT	Coordenadas con respecto al ATG de <i>casB</i>
<i>casB</i> +154/+181 F B/K	<u>GAT CCT</u> GGC GCC GCC ATA TGG CGT AAT GAT ATG GTA C	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i> , sitios de restricción 5' <i>BamHI</i> y 3' <i>Kpn I</i>
<i>casB</i> +154/+181 <i>B/K</i> R	<u>CAT</u> ATC ATT ACG CCA TAT GGC GGC GCC AG	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i>
<i>casB</i> +202/+262 F B/K	<u>GAT CCA</u> GTT GAA AAG AAT GGC GCC GCC ATA TGG CGT AAT GAT ATG TGA AGG ACA TGA CGC TCT CCG GTA C	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i> , sitios de restricción 5' <i>BamHI</i> y 3' <i>Kpn I</i>
<i>casB</i> +202/+262 <i>B/K</i> R	<u>CGG</u> AGA GCG TCA TGT CCT TCA CAT ATC ATT ACG CCA TAT GGC GGC GCC ATT CTT TTC AAC TG	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i>
pQE <i>casB</i> - F / <i>NcoI</i>	CAT <u>GCC ATG GTG</u> AAT AGC AAT ACA GCA GTG	Oligo utilizado para amplificar <i>casB</i> a partir de su ATG, sitio de corte 5' <i>Nco I</i>
pQE <i>casB</i> - R / <i>BamHI</i>	<u>CGG GAT CCT</u> TTG CCA CGC GAC GTG GAA AG	Oligo utilizado para amplificar <i>casB</i> a partir de su codón de término TAA, el cual fue sustituido por *TTT*, sitio de corte 5' <i>BamHI</i>
anti- <i>casB</i> - F - <i>XbaI</i> (+181/+161 hebra reversa)	<u>GCT CTA GAG</u> CAT ATC ATT ACG CCA TAT GGC	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i> hebra 3', utilizado para amplificar la región promotora del RNA antisentido <i>casBA</i>
<i>casB</i> - <i>XmaI</i> F (-450/-431)	CCC <u>CCC GGG</u> GGG TT CCG CTC ATT AGC GTT TCG	Coordenadas respecto al ATG de <i>casA</i> , con sitio de corte 5' <i>Xma I</i>
3070 R <i>Hind</i> -40 (<i>casA</i> +1149/+1130)	CCC <u>AAG CTT</u> GAG AAA TTG CTC TTC GTG CG	Coordenadas respecto al ATG de <i>casA</i> con sitio de corte 5' <i>Hind III</i>
<i>casB</i> +134/+115 <i>HindIII</i> R	CCC <u>AAG CTT</u> GCA GGC GCG ACC GTT GAC TC	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i> , con sitio de corte 5' <i>Hind III</i>
<i>casB</i> +181/+162 <i>HindIII</i> R	CCC <u>AAG CTT</u> GAT ATC ATT ACG CCA TAT GG	Coordenadas respecto al ATG de <i>casB</i> , con sitio de corte 5' <i>Hind III</i>
CRISPR- <i>Xho</i> R (<i>cas2</i> +500/+481)	<u>ctc gag</u> aac gtc ctg ata tgc tgg tga aac	Coordenadas respecto al ATG de <i>cas2</i>

STY3064-prom- R (<i>cas2</i> +202/+180)	cgc cat aac aac cat ttc cct c	Coordenadas respecto al ATG de <i>cas2</i>
STY3070-RT (<i>casA</i> -56/-31)	tat agg tag gta ata ttc caa att g	Coordenadas respecto al ATG de <i>casA</i>
STY3070 NB F (<i>casA</i> +800/+821)	<u>CGG GAT CC</u> cga atc ctg cta ctg caa atg c	Coordenadas respecto al ATG de <i>casA</i>
STY3067 <i>Bam</i> HI F -2(<i>casC</i> +120/+140)	<u>cgg gat cca</u> tcg tcg caa agt ctg aag c	Coordenadas respecto al ATG de <i>casC</i>
<i>casE</i> prom B F (-295/-272)	<u>CGG GAT CC</u> gca ttt tcc gct cta tct ggg gag	Coordenadas respecto al ATG de <i>casE</i>
<i>cas2</i> prom- F (-212/-187)	<u>CGG GAT CC</u> cga cgt aat cct gcc gag ccc gat cg	Coordenadas respecto al ATG de <i>cas2</i>

RESULTADOS

Unidades transcripcionales del sistema CRISPR/Cas de *S. Typhi* en MM-N

Para determinar si el locus CRISPR/Cas forma un mRNA policistrónico, desde el promotor de *casA* hasta los CRISPR, independientemente de LeuO (regulador positivo) en MM-N, se realizaron ensayos de RT-PCR. Se generaron cDNAs utilizando los oligonucleótidos CRISPR-Xho-R y STY3064-prom-R, a través de estos templados se lograron amplificar fragmentos de PCR de *casA*, *casC*, *casE*, *casI* y *cas2* (Fig. 8, B, líneas rojas), demostrando la presencia de un RNA mensajero sintetizado desde el promotor de *casA* hasta los CRISPR de manera independiente de LeuO.

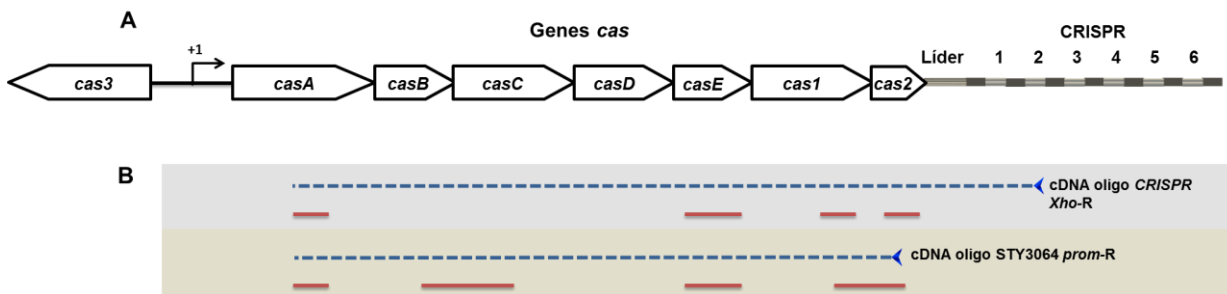


Fig. 8. Identificación de las unidades transcripcionales del sistema CRISPR/Cas mediante RT-PCR. (A) Mapa genético del sistema CRISPR/Cas de *S. Typhi*. (B) se muestran en líneas rojas la posición de los productos de PCR obtenidos a partir de cada cDNA. Con flechas azules se indica la ubicación de los oligos utilizados para amplificar el cDNA.

Para validar estos resultados se diseñaron diferentes fusiones transcripcionales del sistema CRISPR/Cas en *S. Typhi* IMSS-1 (Fig. 9).

Las fusiones transcripcionales: *casA*-9/+191 (coordenadas respecto al inicio de transcripción de *casA*), *casC*-470/+132, *casD*-952/+279, *casE*-472/+235, *casE*-291/+6, *casI*-488/+600, *casI*-195/+6, *cas2*-64/+213, *cas2*-84/+6 (en las fusiones *casC*, *casD*, *casE*, *casI* y *cas2* las coordenadas son respecto al ATG del gen en cuestión) y CRISPR+213/+798 (coordenadas respecto al ATG de *cas2*) presentaron actividad transcripcional basal (Fig. 9, B), este ensayo se repitió tres veces obteniendo resultados similares. Las fusiones transcripcionales: *PcasA*-375/+191, *casB*-450/+181, *PcasA-cas2* y *PcasA-CRISPR* se expresaron en MM-N independientemente del regulador transcripcional LeuO. La fusión *casB*-450/+181 (Fig. 9, B) no incluye el promotor de *casA*; sin embargo, presenta actividad

específica CAT. Este resultado sugiere un promotor en *casB*, denominado *PcasB-450/+181* (coordenadas respecto al ATG de *casB*). También comprobamos que promotor en *casA* se expresa en MM-N, como se había reportado previamente en Medina-Aparicio *et al.*, 2011.

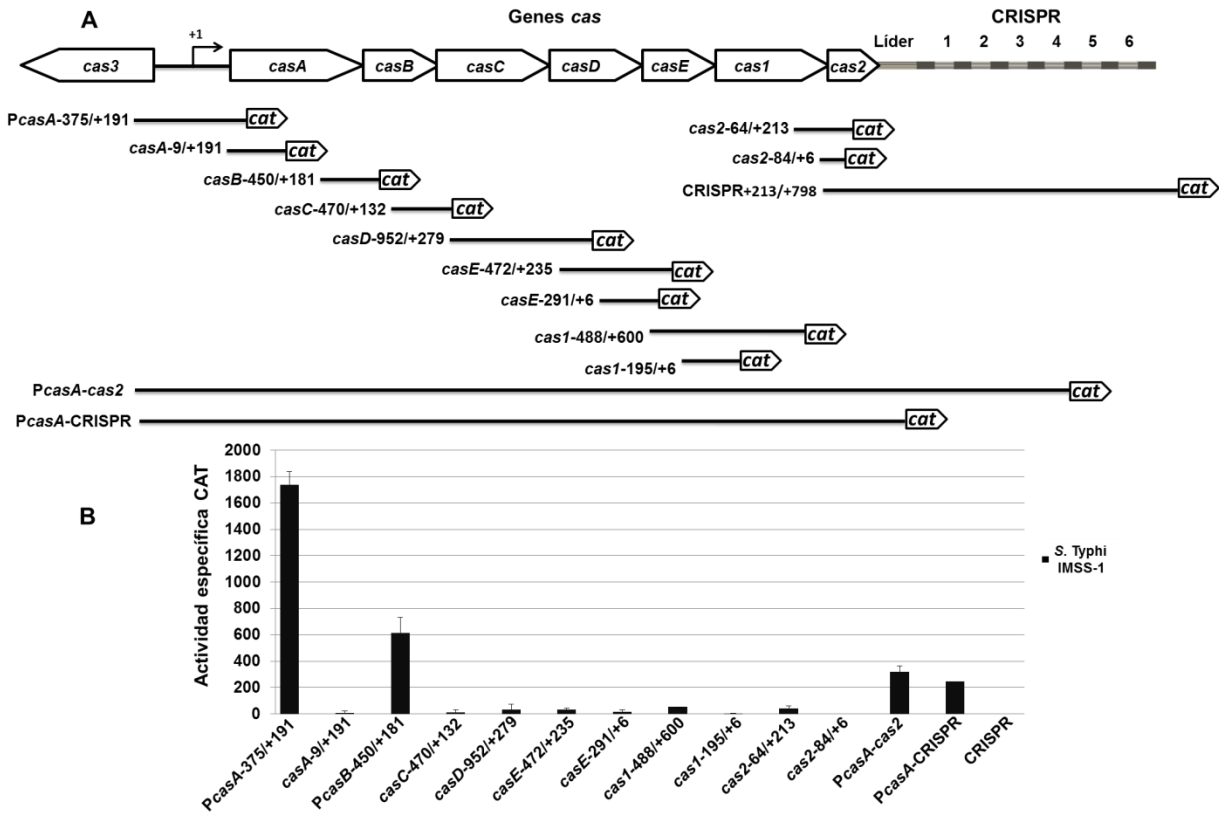


Fig. 9. Perfil transcripcional de diferentes regiones del locus CRISPR/Cas en *S. Typhi*. (A) Se muestra el arreglo genético del locus CRISPR/Cas en *S. Typhi* IMSS-1. Se indican los diferentes fragmentos fusionados al gen reportero *cat* (cloranfenicol acetil transferasa). (B) se presenta el perfil transcripcional de las regiones intergénicas evaluadas en MM-N. La actividad específica CAT fue determinada a 16 h de crecimiento bacteriano ($D.O_{595} \geq 1.2$). Se muestran los resultados representativos de dos experimentos independientes.

Los resultados obtenidos hasta ahora indican la presencia de dos unidades transcripcionales generadas a partir de los promotores de *casA* y *casB*. Lo anterior indica que el locus CRISPR/Cas de *S. Typhi* es un operón complejo en MM-N.

Al observar la actividad transcripcional de las fusiones *PcasA-375/+191* (2 000 unidades CAT), *PcasA-CRISPR* (200 unidades CAT) (Fig. 9) es claro que hay mecanismos de regulación en la expresión a lo largo del operón CRISPR/Cas, es decir, elementos *in cis* o *in trans*, que explicarían la disminución de la expresión 10 veces menor en el fragmento *PcasA-*

CRISPR. Para determinar en qué nucleótido empieza a disminuir la expresión de *PcasA* a lo largo del operón, se diseñaron fusiones transcripcionales desde el promotor de *casA* (pKK*casA*-51/+191, coordinadas respecto al inicio de transcripción de *casA*) el cual se expresa constitutivamente, debido a que se eliminaron sitios de represión de H-NS y LRP (Medina-Aparicio *et al.*, 2011), esta fusión transcripcional, en MM-N, presenta valores de 4 000 unidades CAT. A partir del extremo 3' se fue añadiendo secuencia nucleotídica (secuencia codificante del operón) de manera gradual hasta llegar al promotor de *casB* y se determinó su actividad transcripcional en MM-N (Fig. 10). Las coordenadas de las fusiones evaluadas se indican con respecto al inicio de transcripción de *PcasA* (pKK*casA*-51/+1149, pKK*casA*-51/*casB*+134, pKK*casA*-51/*casB*+181) (Fig. 10). Estas fusiones fueron evaluadas en una cepa de *S. Typhi* IMSS-1 silvestre en diferentes fases del crecimiento bacteriano (Fig. 10, B).

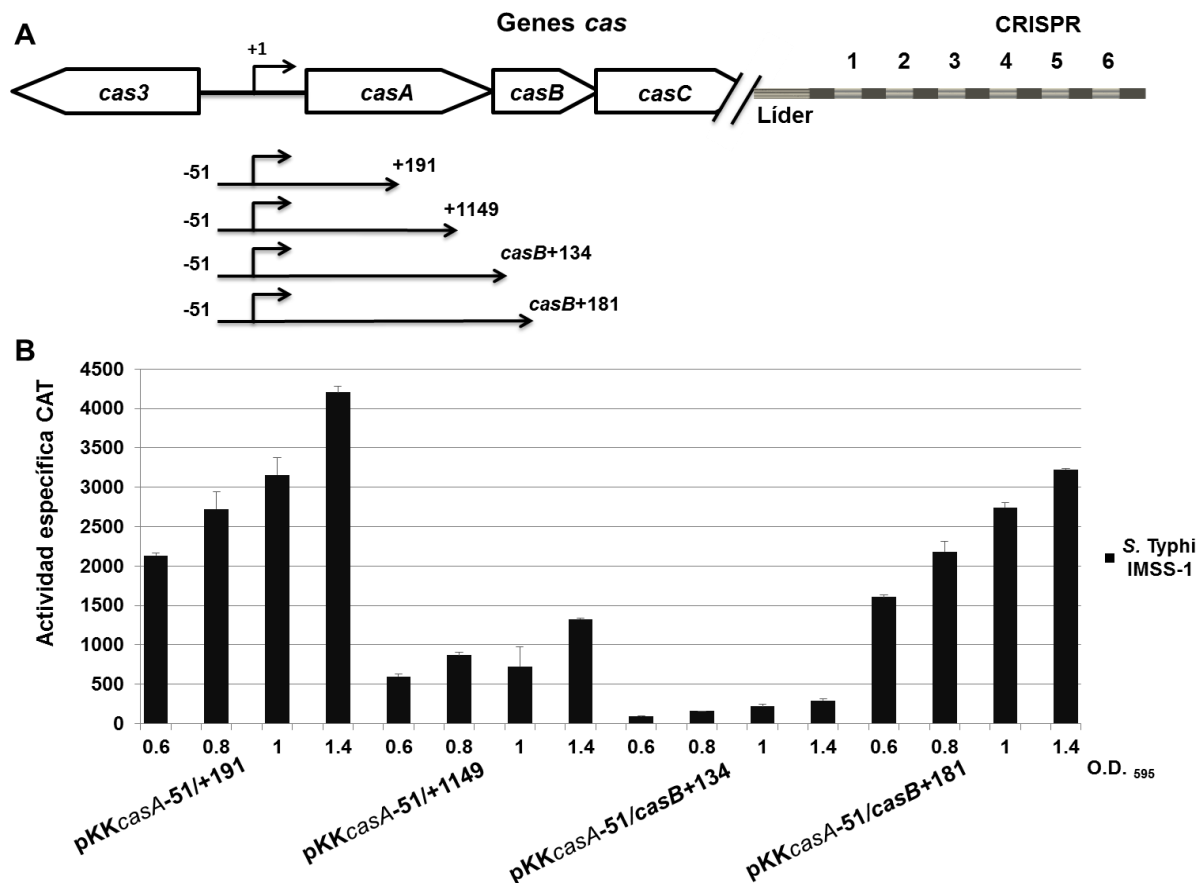


Fig. 10. Fusiones transcripcionales de la región promotora de *casA*. (A) Mapa genético del sistema CRISPR/Cas en *S. Typhi* y ubicación de las fusiones evaluadas. Las coordenadas se presentan respecto al inicio de transcripción de *casA* (+1). (B) Perfil de expresión de la fusiones transcripcionales señaladas. La actividad CAT se determinó en diferentes puntos de crecimiento bacteriano (D.O.₅₉₅) en MM-N. Grafica representativa de tres experimentos independientes.

En la Fig.10, B se puede observar que las fusiones pKK*casA*-51/+1149 y pKK*casA*-51/*casB*+134 muestran una disminución de tres a cuatro veces de actividad CAT comparada con el recorte pKK*casA*-51/+191. Lo anterior sugiere elementos de regulación negativa entre los nucleótidos *casA*+191 al *casB*+134 respecto al +1 de *casA*. Posteriormente, en la fusión pKK*casA*-51/*casB*+181, la cual incluye 47 nucleótidos más hacia el extremo 3', incluyendo el promotor de *casB* (*casB*-450/+181), la actividad aumenta a niveles de 4 000 unidades CAT, parecidas a las de la fusión pKK*casA*-51/+191. Este fenómeno de incremento puede deberse a la contribución del promotor de *casB* o a la presencia de un desrepressor en esta zona del operón.

Para definir si la regulación negativa, observada en la Fig. 10, B, está mediada por elementos genéticos intrínsecos del locus CRISPR/Cas, se evaluaron la fusiones pKK*casA*-51/+1149, pKK*casA*-51/*casB*+134 y pKK*casA*-51/*casB*+181 en una cepa *S. Typhi* IMSS-1 silvestre y *S. Typhi* ΔCRISPR/Cas (Fig. 11).

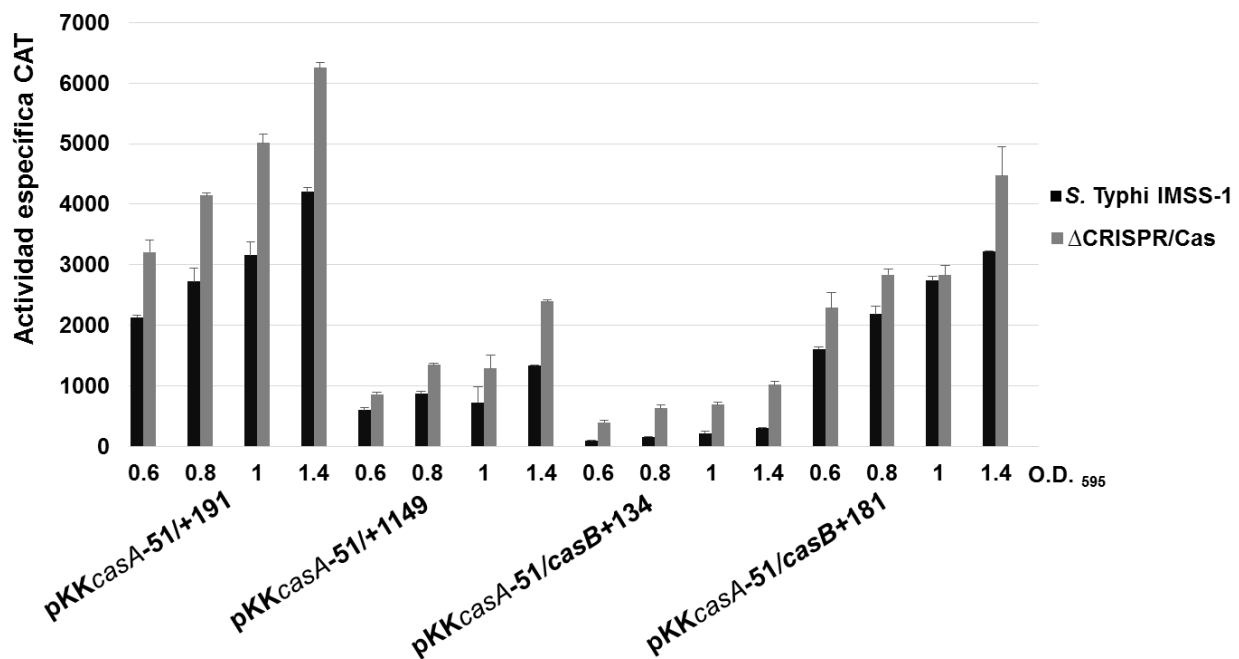


Fig. 11. Fusiones transcripcionales de la región promotora de *casA* en *S. Typhi* ΔCRISPR/Cas. Perfil de expresión de la fusiones transcripcionales señaladas, las coordenadas se presentan respecto al inicio de transcripción de *casA* (+1). La actividad CAT se determinó en diferentes puntos de crecimiento bacteriano (D.O.₅₉₅) en MM-N. Gráfica representativa de tres experimentos independientes.

Los resultados de la Fig. 11 muestran, en todos los casos, diferencias de expresión en las fusiones evaluadas al comparar entre cepa silvestre y ΔCRISPR/Cas. Por ejemplo, la fusión

pKK*casA*-51/+191 presenta 6 000 unidades CAT en la cepa Δ CRISPR/Cas y 4 000 unidades en la cepa *S. Typhi* wt, a una O.D.₅₉₅ de 1.4. Esta diferencia de un tercio en la actividad específica CAT, se conserva en todas las fusiones evaluadas y es clara en casi todos los puntos muestreados. ¿Cuál es el significado biológico de esta observación? Estos resultados sugieren que hay elementos de regulación transcripcional codificados dentro del operón CRISPR/Cas de *S. Typhi*, capaces de atenuar la transcripción en la fusión plásmidica. En conclusión, este análisis por fusiones transcripcionales, evidencia diversas posibilidades de regulación de la expresión del sistema CRISPR/Cas a nivel génico e independiente de la modulación dada en el promotor principal (*PcasA*). También es probable la participación de más reguladores protéicos o elementos en *cis*, tales como estructuras secundarias del DNA, que podrían reprimir la expresión del operón entre los nucleótidos *casA*+191 al *casB*+1779 de la región codificante de *casA*. Es posible también, la existencia de otros mecanismos de atenuación o modulación de la expresión a través de RNA pequeños o RNAs antisentido, lo cual es común en operones complejos (Sesto *et al.*, 2013).

Identificación de RNAs antisentido del sistema CRISPR/Cas

Como primer experimento para determinar la presencia de RNAs antisentidos en la cadena complementaria del operón CRISPR/Cas realizamos ensayos de RT-PCR. Con los oligonucleótidos: 3070RT, 3070NBF, 3068BF2, 3067BF2 y *cas2*-promF se generaron cDNAs, a partir de ellos se amplificaron diferentes PCRs. Estos fragmentos (indicados en rojo en la Fig. 12) contienen: *casB-casA*; *casE-casD*; *casI-casE* y con el último cDNA se obtuvo *cas2*.

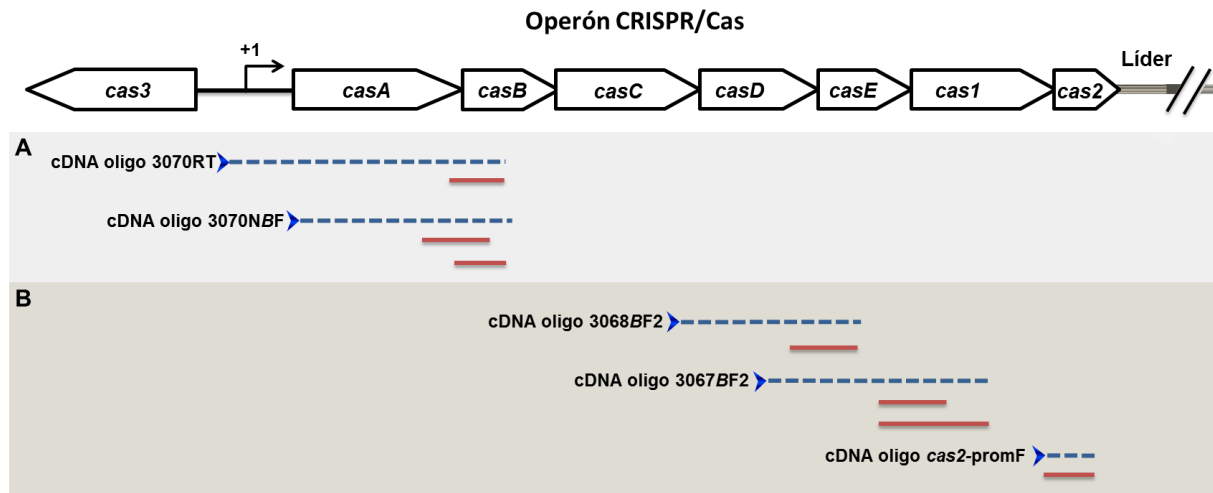


Fig. 12. Representación esquemática de los productos de RT-PCR para detectar RNAs antisentidos del sistema CRISPR/Cas en *S. Typhi*. Sintetizamos diferentes cDNAs (en azul) a partir de oligonucleótidos que hibridan con los RNAs antisentidos del locus CRISPR/Cas. PCRs fueron amplificadas (líneas rojas) utilizando como templado estos cDNA.

Los resultados indican diversos RNAs antisentidos. El primero sintetizado desde el nucleótido +134 respecto al ATG de *casB* hasta el nucleótido -56 respecto al ATG de *casA* (Fig. 12, A). Los cDNAs 3068BF2 y 3067BF2 comparten secuencia nucleotídica y podrían haberse amplificado a partir de un RNA antisentido transcrito desde *casI* hasta *casC*. Otro transcrito detectado fue en *cas2*.

El presente estudio demuestra la presencia de RNAs antisentidos en el “cluster” CRISPR/Cas de *S. Typhi*, los cuales podrían estar modulando negativamente la expresión del sistema como se observó en la Fig. 9 y Fig. 11 (*PcasA-cas2*, *PcasA-CRISPR*). La evidencia por RT-PCR sugiere promotores antisentidos en *casB*, *casE*, *cas1* y *cas2* (Fig. 12).

Identificación de un promotor antisentido del locus CRISPR/Cas

Para demostrar la presencia de promotores antisentido, se realizaron diferentes fusiones transcripcionales 5'-3' de la cadena complementaria de *casB*, *casE*, *casI* y *cas2*. Estas fueron evaluadas en MM-N, condición en la cual se expresa los genes *cas* y los RNAs antisentido podrían ser funcionales (Fig. 9). Solo la fusión antisentido de *casB*, pRS415+181/-450 (+181 a -450 respecto al ATG de *casB*) (Fig. 14, A), mostró actividad de 600 unidades β -Gal (dato no mostrado). Este resultado confirma un promotor antisentido en *casB*, correspondiendo con los datos de RT-PCR.

Para determinar el inicio de transcripción de este promotor antisentido, realizamos un ensayo de "primer extension" a partir de *S. Typhi* IMSS-1 conteniendo el plásmido pRS415+181/-450, cultivada en MM-N, condición en la cual se expresa el promotor antisentido contenido en la fusión. La síntesis de cDNA y la reacción de secuencia, se realizaron con el oligonucleótido *casB*^{3'} *Bam*HI-F (Tabla 4) marcado radioactivamente. Identificamos un inicio de transcripción a +153 pb respecto al ATG de *casB* (Fig. 13), confirmando la presencia de un promotor antisentido en *casB*.

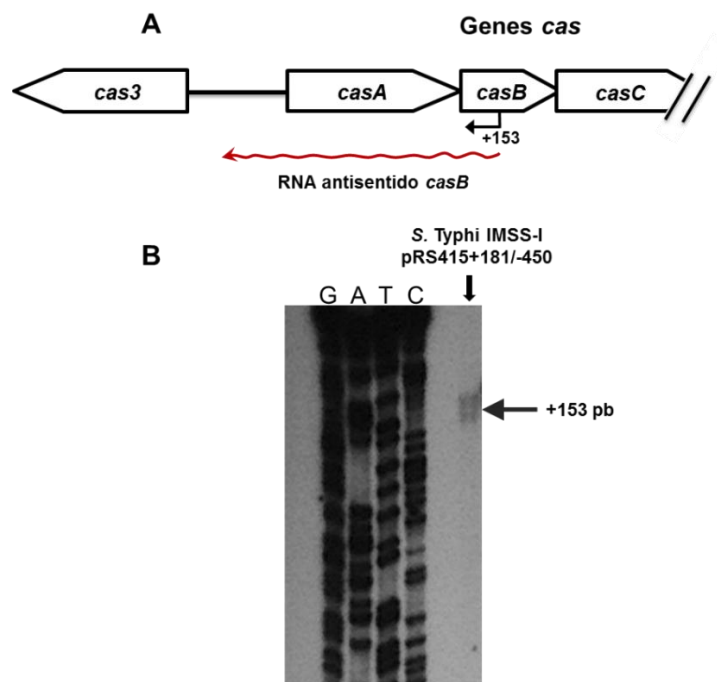


Fig. 13. Esquema del "primer extension" del promotor antisentido en *casB*. (A) Mapa genético del sistema CRISPR/Cas. (B) "primer extension". Se señala con una flecha el inicio de transcripción del RNA antisentido en *casB*, el cual corresponde a la base T, nucleótido +153 respecto al ATG de *casB* (cadena complementaria).

Como se menciona anteriormente, la expresión del promotor antisentido en *casB* fue de 600 unidades β -Gal, esta actividad transcripcional en MM-N nos permitió observar el inicio de transcripción por “primer extension”, sin embargo la señal fue muy tenue (Fig. 13, B). Por lo tanto, nosotros exploramos en que condición muestra mayor expresión la fusión pRS415+181/-450, con el fin de detectar con mayor intensidad el inicio de transcripción en los ensayos de “primer extension”. Debido a que el sistema CRISPR/Cas se expresa mejor en MM-N y el RNA antisentido podría funcionar en esta condición, se decidió modificar los algunos componentes del MM-N y evaluar la expresión de la fusión en cuestión. Este medio se compone de KCl 5 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7.5 mM, K_2SO_4 0.5 mM, KH_2PO_4 1 mM, Tris-HCl (pH7.5) 100 mM, MgCl_2 200 μM , 0.5% de glicerol y 0.1% de casaminoácidos. Debido a que el MM-N tiene un pH de 7.5 (alcalino), decidimos evaluar la expresión del promotor antisentido (pRS415+181/-450) en diferente pH (6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 7.7), suplementado el MM-N con Tris 200 mM, lo anterior, con el fin de mantener constante el pH a lo largo del crecimiento bacteriano. En la Fig. 14, B se observa la expresión de un promotor en la hebra complementaria de *casB*, el cual se induce dependientemente de pH, alcanzando niveles máximos de 905 unidades β -Gal en pH 7.5 a una O.D.₅₉₅ de 0.8.

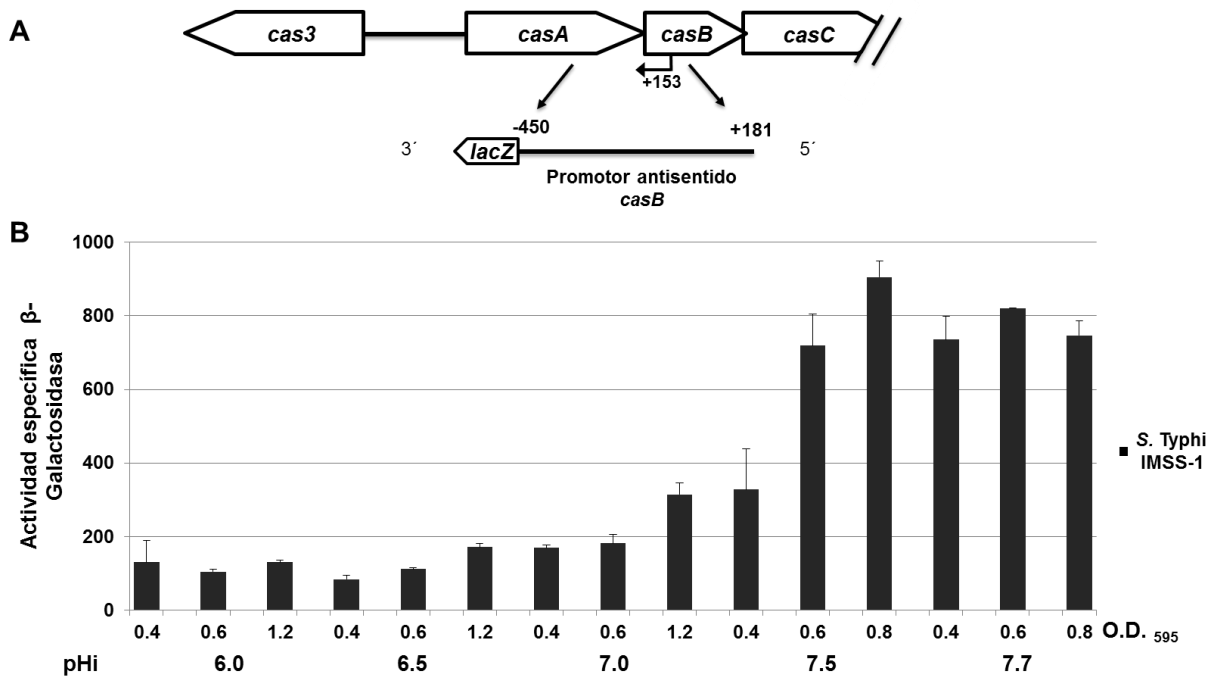


Fig. 14. Perfil transcripcional del promotor antisentido *casBA* (pRS415+181/-450) en *S. Typhi* IMSS-1. (A) representación genética de la fusión transcripcional pRS415+181/-450. (B) perfil de expresión del promotor antisentido *casAB*. La actividad se determinó en diferentes puntos del crecimiento bacteriano (O.D.₅₉₅), evaluado en MM-N Tris 200 mM en diferente pH.

Para confirmar los resultados de expresión del promotor antisentido *casB* en diferente pH, se realizó un “primer extension” a partir de *S. Typhi* IMSS-1 conteniendo el plásmido pRS415+181/-450, la cepa fue cultivada en MM-N Tris 200 mM pH 7.5, en donde el promotor antisentido presenta su máxima expresión (905 unidades β -Gal, Fig. 15) y en MM-N Tris 100 mM, en este medio el promotor antisentido muestra una actividad menor (600 unidades β -Gal). El resultado mostrado en la Fig. 15 confirma un inicio de transcripción a +153 pb respecto del ATG de *casB* (cadena complementaria). Además la señal fue más intensa en MM-N Tris 200 mM (Fig. 15 B, carril 2) que en MM-N Tris 100 mM (Fig. 15 B, carril 1), esto corresponde con los resultados previos de actividad transcripcional (Fig. 14, B).

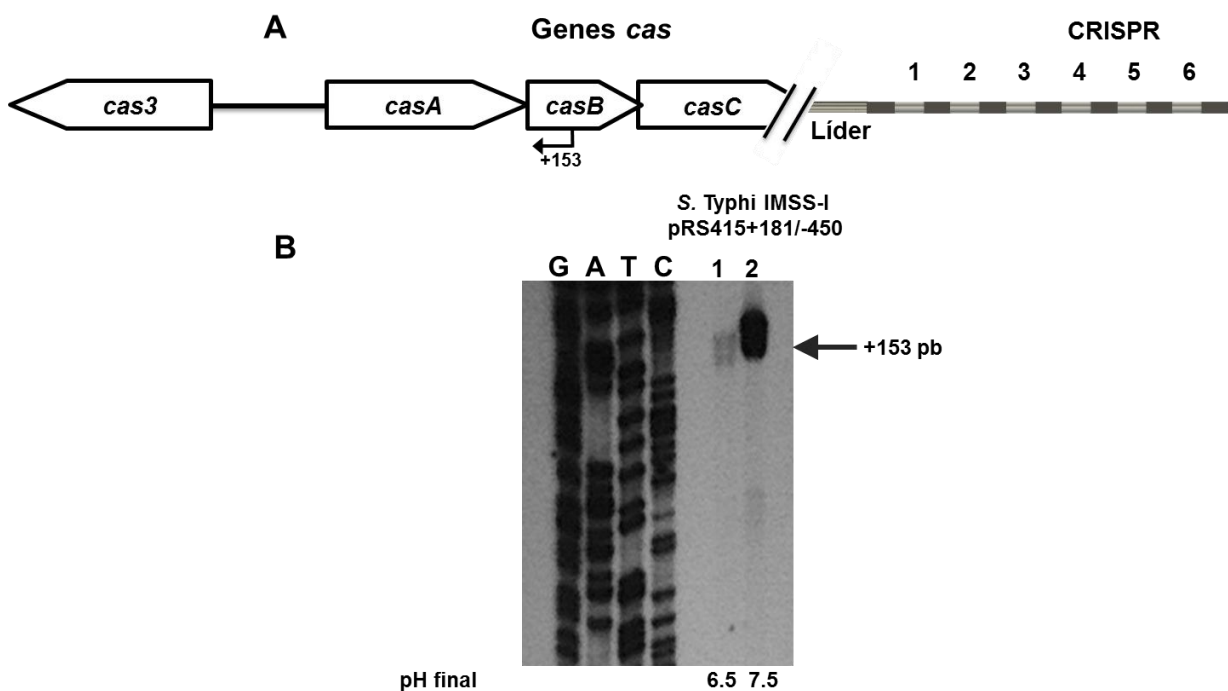


Fig. 15. “Primer extension” de promotor antisentido de *casB* en diferente pH. (A) Mapa genético del sistema CRISPR/Cas. (B) “primer extension”. Se señala con una flecha la posición del inicio de transcripción del RNA antisentido *casB*. En el carril “1” se cargó la muestra obtenida a partir de un cultivo en MM-N 100 mM. En “2” se cargó la muestra correspondiente a MM-N Tris 200 mM. Se indica el pH final del medio de cultivo al pie de la autoradiografía.

Con estos resultados se determinó la existencia de un promotor antisentido en *casB*, el cual se induce en MM-N con pH alcalino 7.5. *S. Typhi* sobrevive en condiciones de pH 7.5 cuando se encuentra en la fracción distal del intestino delgado (Evans *et al.*, 1988). Esto sugiere que el locus CRISPR/Cas podría expresarse en esta etapa de la vía de infección y ser modulado por RNAs antisentido. Existe evidencia que demuestra la actividad del sistema

CRISPR/Cas en el ambiente intestinal de humano. En un estudio metagenómico, se analizaron las secuencias CRISPR de la microbiota intestinal, detectándose espaciadores provenientes de fagos presentes en los voluntario estudiados, sugiriendo la actividad de sistema CRISPR/Cas en interacciones bacteria-fago (Stern *et al.*, 2012). También, se ha demostrado la participación del “cluster” CRISPR/Cas en la virulencia de *Francisella novicida*, cuando este patógeno se encuentra en el intestino humano (Jones *et al.*, 2012; Sampson *et al.*, 2013).

Efecto del pH en la regulación transcripcional del sistema CRISPR/Cas (subtitulo)

En este estudio se ha demostrado que la señal de inducción del promotor antisentido de *casB* es pH alcalino 7.5. Para determinar si los promotores en sentido de *casA* y *casB* responden a la misma señal, estudiamos el efecto pH alcalino de 7.5 (condición del intestino distal) (Evans *et al.*, 1988) sobre su expresión. Evaluamos la actividad transcripcional de estos promotores en diferente pH (6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 7.7) en MM-N Tris 200 mM. La actividad transcripcional del promotor en sentido *PcasB*-450/+181 cambia de acuerdo al incremento de pH, indicando que su expresión es dependiente de este factor químico (Fig. 16). El promotor de *casA* no mostró diferencia de expresión en las condiciones evaluadas (datos no mostrados).

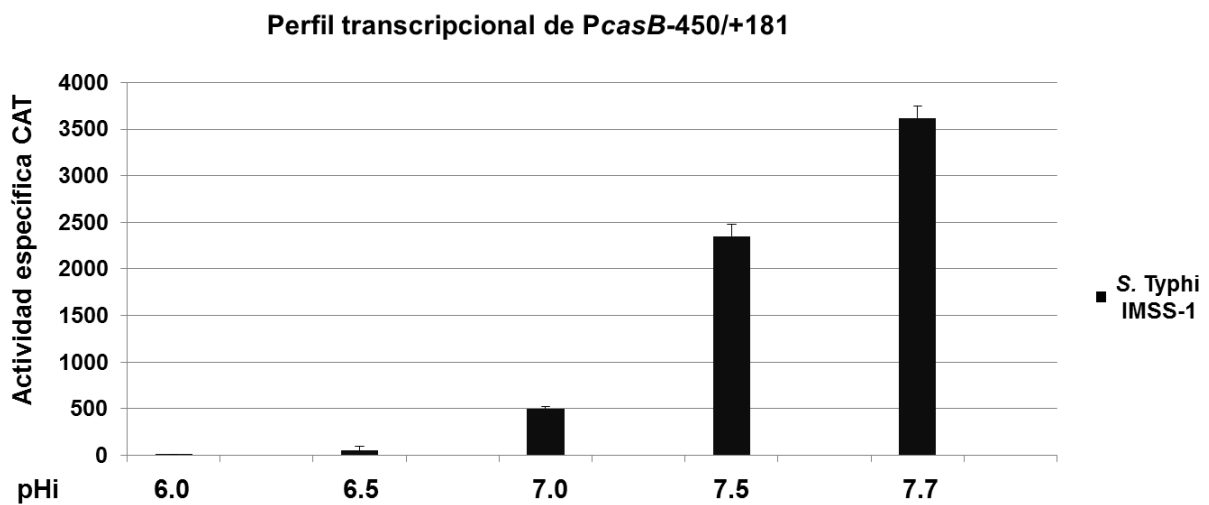


Fig. 16. Perfil de expresión del promotor de *casB* (*PcasB*-450/+181) en diferentes pHs, evaluado en MM-N Tris 200 mM. En el eje X se indica el pH inicial (pHi) del medio de cultivo. La actividad específica CAT fue determinada a las 16 h de crecimiento bacteriano en tres experimentos independientes.

Los resultados anteriores indican que el pH alcalino es la señal de inducción para *casB* en MM-N. Para confirmar que la señal inductora de *casB* es el pH y esta no depende del medio de cultivo, se evaluó la actividad transcripcional de *casB* en MM-N y medio nutritivo A (MA) suplementado con Tris 200 mM. La actividad de *casB* se determinó en las distintas etapas del crecimiento bacteriano en diferentes pHs (Fig. 17).

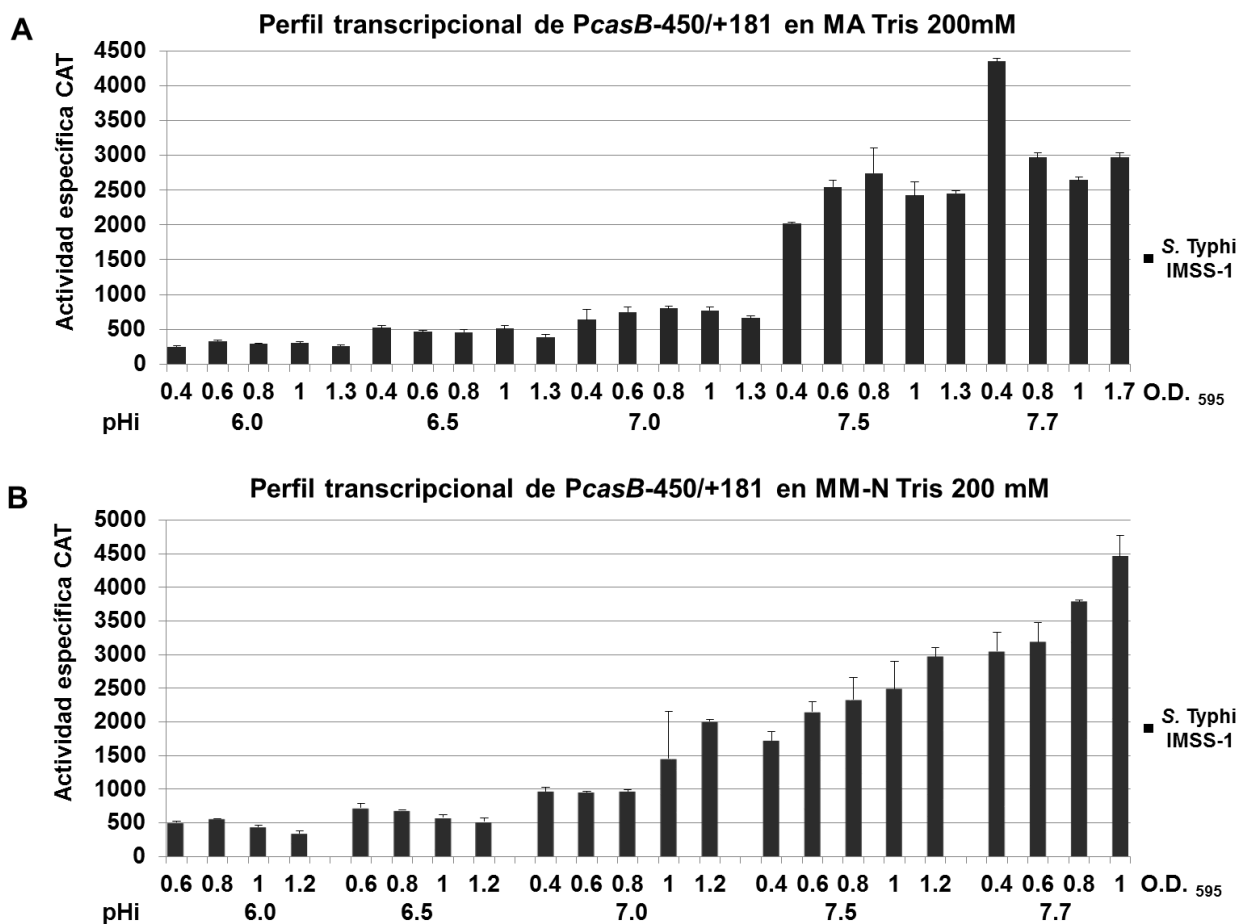


Fig. 17. Perfil transcripcional del promotor *casB* (*PcasB-450/+181*) en *S. Typhi* durante fase de adaptación, exponencial y estacionaria, evaluado en diferentes pHs. En el eje X se indica el pH inicial del medio de cultivo. (A) se muestra la actividad CAT de *PcasB-450/+181* evaluado en MA Tris 200 mM. (B) Perfil de actividad CAT de *PcasB* evaluado en MM-N Tris 200 mM.

Se puede observar en la Fig. 17 que los patrones de expresión de *PcasB-450/+181* en MA y MM-N son similares. Estos resultados demuestran que el pH alcalino (7.5 y 7.7) es una señal de inducción para *PcasB-450/+181* y es independiente del medio de cultivo.

Con el objetivo de descartar que el patrón de expresión de *casB* observado, bajo el reportero CAT, fuese un artefacto, se evaluó la actividad transcripcional de *PcasB-450/+181* fusionado al gen reportero *lacZ* (*PRS415casB-lacZ*) en MM-N bajo un gradiente de pH. Los resultados muestran un aumento actividad β -galactosidasa proporcional al aumento de pH (Fig. 18). Los datos anteriores validan que el pH alcalino es una señal de activación para *casB*.

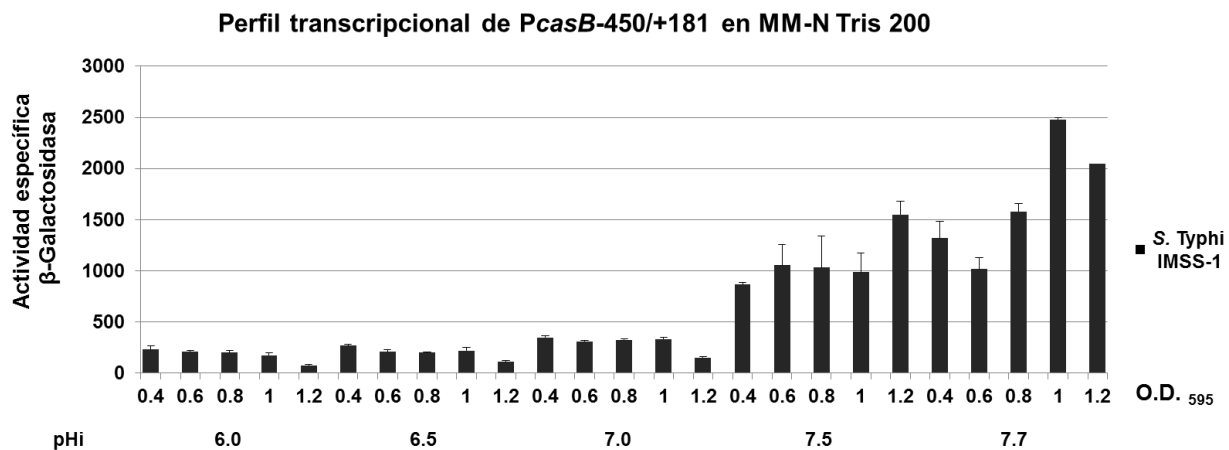


Fig. 18. Perfil de actividad β -Galactosidasa del Promotor *casB* (*PcasB-450/+181*) en *S. Typhi* IMSS-1. La actividad fu evaluada en fase de adaptación, exponencial y estacionaria (O.D. ₅₉₅) a diferentes pHs en MM-N Tris 200 mM.

Estos resultados indican que el promotor en sentido *casB-450/+181* y el promotor antisentido de *casB* responden a las mismas señales ambientales de pH alcalino 7.5. Sin embargo, la expresión del promotor de *casA* no mostró cambios de expresión (datos no mostrados). Los resultados confirman que el sistema CRISPR/Cas cuenta con diferentes estrategias para regular su expresión.

Delimitación de la región promotora de *casB-450/+181* regulada por pH

Para definir la zona de regulación por pH en el promotor *casB-450/+181*, se realizaron fusiones transcripcionales eliminando paulatinamente secuencias de 60 nt aproximadamente en la región 5' de *casB* (Fig. 19, A). La fusión transcripcional de *PcasB-450/+181* presenta una actividad de 658 unidades CAT en MM-N Tris 100 mM y 4 000 unidades CAT en MM-N Tris 200 mM. Los recortes generados posteriormente, tales como (coordenadas respecto al ATG de *casB*): *casB-199/+181*, *casB-142/+181*, *casB-102/+181*, *casB-62/+181*, *casB-7/+181*, *casB+32/+181*, *casB+111/+181* y *casB+134/+181*, no presentaron cambios en la actividad transcripcional (datos no mostrados) en los medios evaluados. Basados en esta información se construyeron dos fusiones transcripcionales adicionales (*casB+142/+181* y *casB+154/+181*). En resumen, la Fig. 19 muestra el perfil transcripcional de las fusiones *casB-450/+181*, *casB-62/+181*, *casB+134/+181*, *PcasB+142/+181* las cuales muestran una expresión similar. Estos resultados revelan la ausencia de sitios de regulación por pH en la región 5' de *casB*, específicamente entre los nucleótidos -450 a +142 con respecto al inicio de traducción (ATG,

Fig. 19, A). Por otro lado, la fusión *casB*+154/+181 mostró actividad 8 veces menor que la región completa (*PcasB*-450/+181) (Fig. 19, B). Con los resultados obtenidos se logró delimitar el promotor de *casB* regulado por pH, esta región comprende los nucleótidos +142 al +181 respecto al ATG de *casB* (***PcasB*+142/+181**).

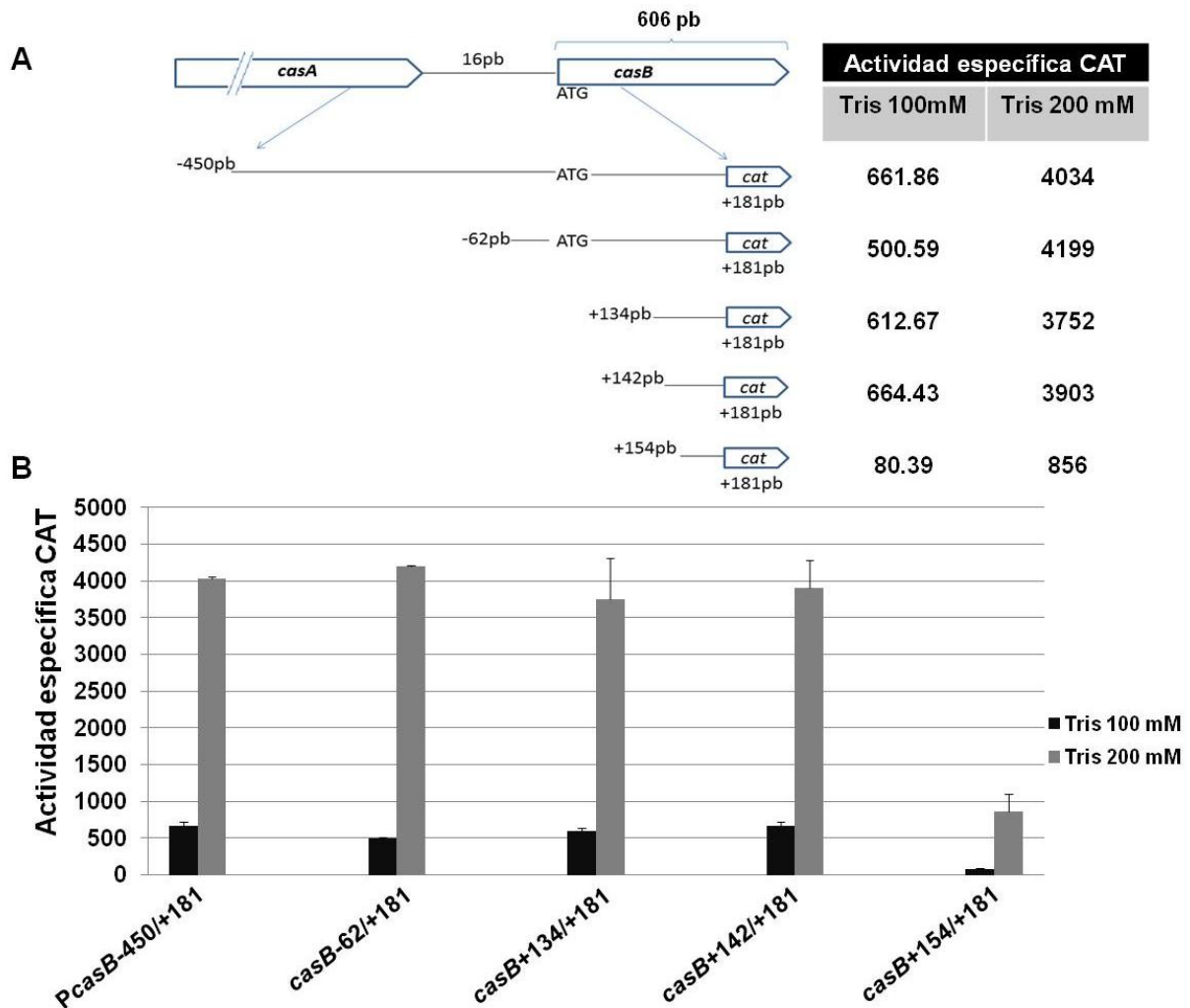


Fig. 19. Expresión transcripcional en diferentes fusiones de la región reguladora de *casB*. (A) Recortes de la región reguladora del gen *casB* de *S. Typhi*, fusionadas al gen reportero *cat* en el vector pKK232-8. Se muestran las coordenadas respecto del inicio de traducción (ATG) de *casB*. (B) Se presenta el perfil de expresión de las diferentes fusiones de *casB* evaluadas en la cepa *S. Typhi* IMSS-1 silvestre en MM-N Tris 100 mM y MM-N Tris 200 mM pH 7.5. La actividad específica CAT fue determinada a 16 h de crecimiento (D.O.₅₉₅ ≥ 1.2).

Con el objetivo de definir zonas de regulación por pH e identificar hasta que nucleótidos hay actividad transcripcional en el extremo 3' del *PcasB*+142/+181, se construyeron diferentes fusiones transcripcionales, las cuales, incluyen el *PcasB*+142/+181

más un número variable de nucleótidos de la zona 3' de *casB*: *casB*+142/+202, *casB*+142/+222 y *casB*+142/+267 (Fig. 20, C). Los resultados obtenidos no mostraron actividad transcripcional en las nuevas fusiones evaluadas (Fig. 20, C).

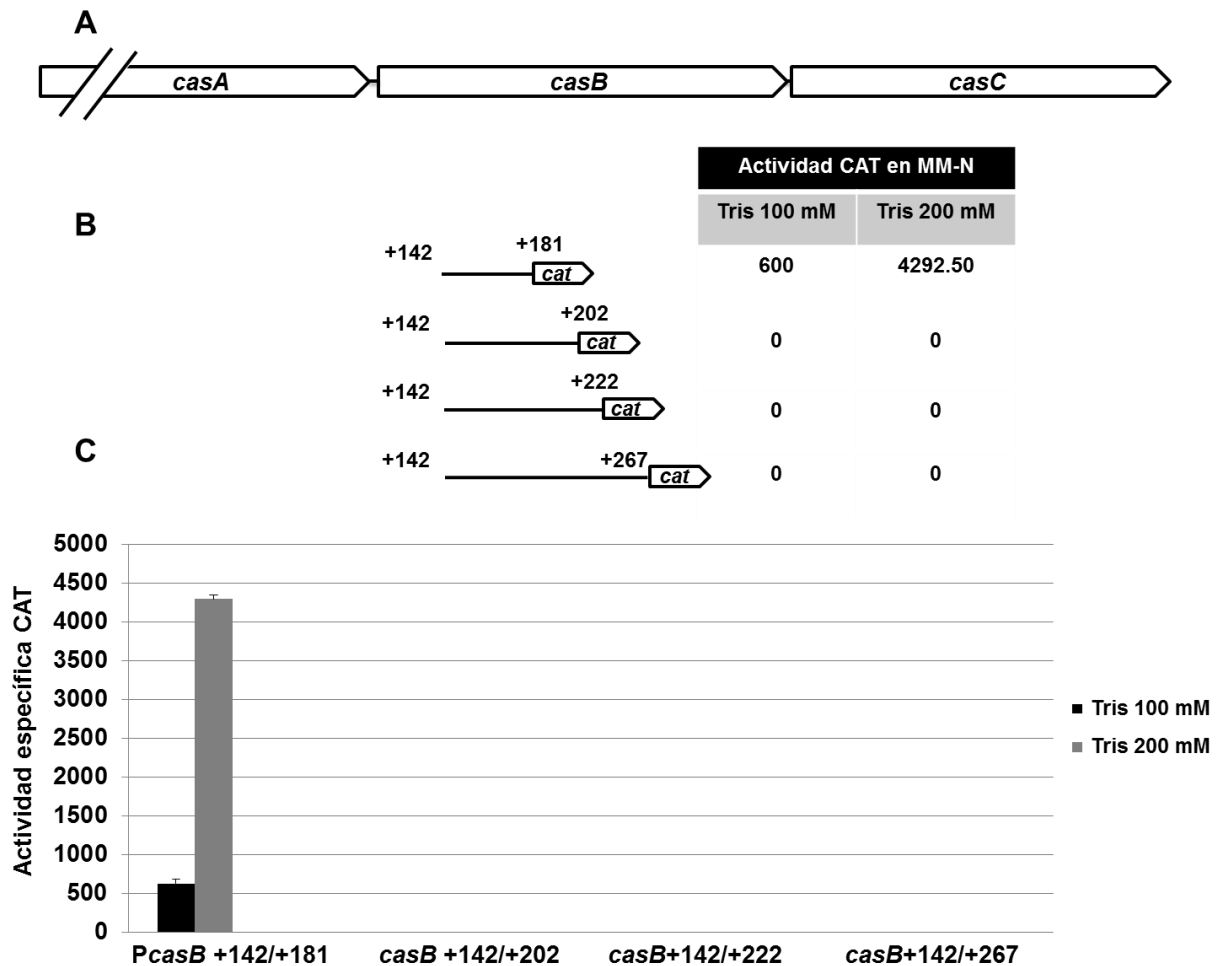


Fig. 20. Fusiones transcripcionales de la región 3' de P*casB*. (A) Representación genética de *casA-casB-casC*. (B) Esquema de fusiones transcripcionales (coordinadas respecto al ATG de *casB*) y tabla actividad específica CAT de cada fusión evaluada en *S. Typhi* IMSS-1 a 16 h de crecimiento MM-N Tris 100 mM y MM-N Tris 200 mM pH 7.5. (C) Gráfica representativa del perfil de expresión transcripcional de las fusiones evaluadas. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes realizados cada uno por duplicado.

Estos experimentos indican la presencia de un terminador entre los nucleótidos +181 y +202 respecto al ATG de *casB*. Por lo tanto el promotor *casB*+142/+181 podría dar origen a un transcrito corto, es decir, un “small RNA” que se expresa dependientemente de pH alcalino.

Por fusiones transcripcionales observamos que el promotor interno en *casB* (*casB*+142/+181) se expresa en MM-N como un transcrito corto, debido a la presencia posibles terminadores en la región codificante de este gen. Estas estructuras terminadoras, ubicadas aproximadamente a +181 pb río abajo del ATG de *casB*, podrían afectar su expresión en condiciones de MM-N, impidiendo la producción de la proteína completa CasB. Por lo tanto, la siguiente pregunta que planteamos resolver fue ¿CasB es una proteína completa e independiente del promotor *casB*+142/+181?

***casB* origina una proteína y un RNA pequeño a partir de promotores independientes**

casB forma parte del operón *casABCDEI2*-CRISPR y contiene un región intergénica 5' de 16 pb, además posee 606 pb desde su ATG hasta el codón de termino TAA y comprendería 202 aa. Para definir si *casB* forma una proteína a partir del promotor de *casA* y su expresión es independiente del promotor *PcasB*+142/+181, realizamos la clonación del gen *casB* en el vector de expresión pQE60 (Fig. 21, A). Esta construcción fue transformada en cepas de *E. coli* M15, posteriormente se indujo la sobreexpresión de *casB* con diferentes concentraciones de IPTG y se obtuvieron las proteínas totales para observarlas en geles de poliacrilamida (Fig. 21). Finalmente, determinamos que *casB* codifica una proteína de 23.93 Kda (Fig. 21, B), la cual corresponde a la reportada en GenBank. Este resultado indica que *casB* se transcribe dependientemente del promotor de *casA*, como parte del mRNA policistrónico *casABCDEI2*-CRISPR, dando origen a una proteína de 202 aa (Fig. 21).

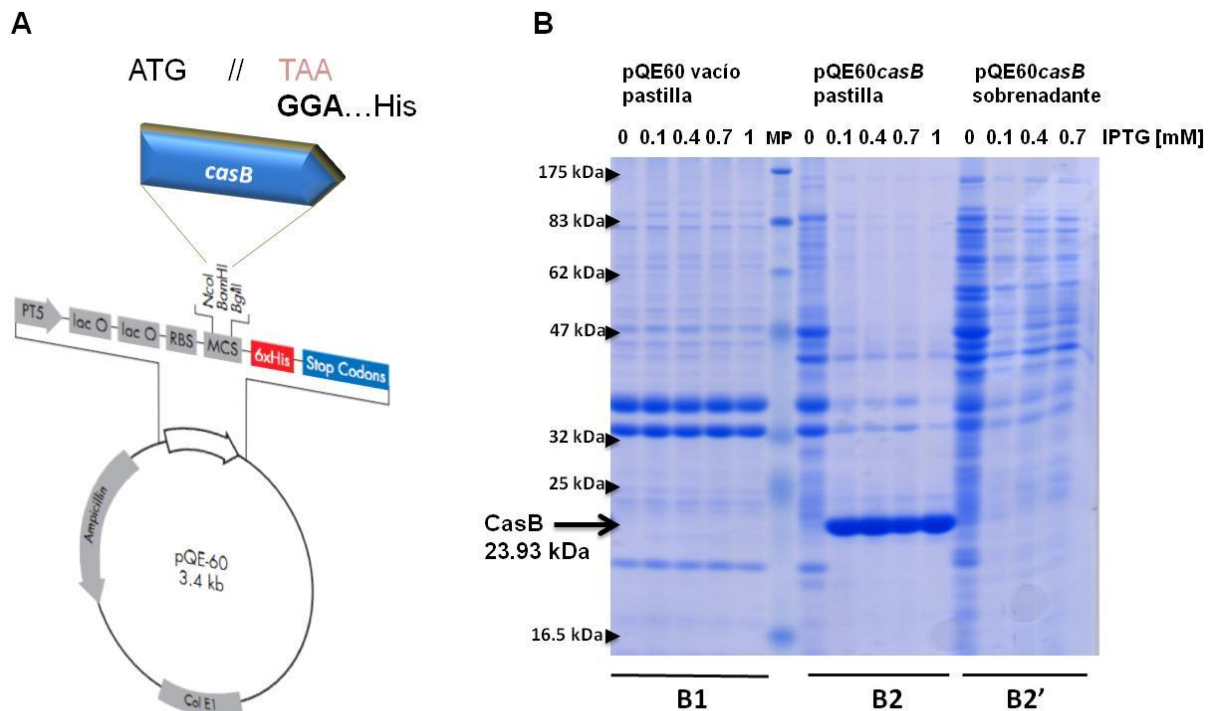


Fig. 21. Perfil electroforético de CasB. (A) Mapa genético del plásmido pQE60 y representación del gen *casB* clonado desde el ATG hasta su codón de término TAA (606 pb), este codón fue sustituido por un codón de histidina GGA. (B) Perfil electroforético de proteínas totales de dos cepas de *E. coli* M15 transformadas con el plásmido pQE60 vacío (B1) y pQE-60*casB* el cual contiene clonado el gen *casB* (B2 y B2'). En B2 se cargaron las proteínas precipitadas (pastillas) y en B2' las proteínas solubles contenidas en el sobrenadante.

Los ensayos realizados anteriormente, demuestran que *casB* tiene dos promotores, uno de ellos se encuentra en la región intergénica 5' de *casA*, este codifica la proteína CasB de 202 aa; el segundo promotor intragénico, ubicado entre los nucleótido +142/+181 respecto al ATG de *casB*, origina un “small RNA”, el cual se expresa en pH alcalino 7.5.

Lo experimentos realizados en este trabajo demuestran que el sistema CRISPR/Cas Tipo I de *S. Typhi* se comporta como operón complejo, dando origen a diversas unidades transcripcionales; que son reguladas en respuesta a diferentes señales ambientales, tales como MM-N y pH 7.5. Determinamos nuevas de zonas de regulación negativa dentro en la región intragénica del operón *casA*, las cuales podrían estar moduladas por los RNAs antisentido, del sistema CRISPR/Cas, descritos en este mismo trabajo. Esta evidencia indica que el “cluster” genético CRISPR/Cas cuenta con diferentes mecanismos de regulación transcripcional, tales proteínas represoras (H-NS y LRP), RNAs antisentido y factores químicos como el pH. Este

trabajo muestra nuevos elementos genéticos, la compleja regulación que gobierna la expresión del sistema CRISPR/Cas en *S. Typhi* y contribuye al entendimiento de las estrategias moleculares que utilizan las bacterias para regular la expresión génica.

DISCUSIÓN

En el mundo microbiano se ha descrito un novedoso sistema que provee inmunidad contra elementos genéticos móviles denominado CRISPR/Cas. Este “cluster” genético se ha clasificado en tres tipos (I, II y III) de acuerdo a las variaciones en sus componentes genéticos (Makarova *et al.*, 2011). El sistema Tipo II ha sido ampliamente estudiado por sus aplicaciones biotecnológicas. En este trabajo se estudió el sistema Tipo I, el cual, aún no se ha logrado consolidar como herramienta molecular poderosa. Esto, probablemente, se debe a la complejidad dada por el número de elementos genéticos que lo conforman y por los mecanismos reguladores que gobiernan su expresión. La presente tesis describe nuevos elementos genéticos del “cluster” CRISPR/Cas Tipo I de *S. Typhi*, los cuales podrían estar presentes en los sistemas ortólogos de bacterias y arqueas. Esto demuestra de manera clara la importancia de este tipo de estudios que contribuyen a la caracterización de los sistemas CRISPR/Cas para poder utilizarlos como herramientas moleculares poderosas.

En este estudio determinamos que el sistema CRISPR/Cas tiene varias unidades transcripcionales, por lo tanto es un operón complejo; definimos nuevas zonas de regulación negativa en la región intragénica de *casA*; finalmente comprobamos la presencia de RNAs antisentido involucrados en la expresión del operón *casABCDE12-CRISPR*.

Por medio de RT-PCR definimos que el primer RNA mensajero se expresa en MM-N a partir del promotor de *casA* (**PcasA**) y se extiende hasta las secuencias CRISPR formando un transcrito policistrónico, el cual incluye a *casABCDE12-CRISPR*. Anteriormente en nuestro laboratorio observamos que el promotor de *casA* origina el mismo transcrito, *casABCDE12-CRISPR*, en medio rico de manera dependiente del activador LeuO. Sin embargo, está expresión mediada por LeuO es de 600 unidades CAT, mientras que en MM-N la expresión es cuatro veces mayor e independiente de LeuO, está actividad es de 2 000 unidades CAT en una cepa de *S. Typhi* silvestre así como en una *S. Typhi leuO*. Lo anterior indica la presencia de nuevos elementos reguladores presentes en MM-N independientes de LeuO. Por esta razón realizamos una exploración para determinar cuáles son los elementos proteicos involucrados en la expresión del promotor de *casA* en MM-N. Lo anterior mediante ensayos de mutagénesis al azar y la evaluación de 30 cepas de *S. Typhi* deletadas en diferentes factores transcripcionales; sin embargo, no se lograron definir elementos reguladores del operón mediante estas

metodologías (datos no mostrados). Para la continuación de este proyecto, es importante explorar otras estrategias para definir los factores transcripcionales involucrados en la regulación del sistema CRISPR/Cas de *S. Typhi* en MM-N.

Para confirmar los resultados de RT-PCR donde observamos que “cluster” CRISPR/Cas forma un operón en MM-N, se construyó una fusión transcripcional desde el promotor *casA* hasta las secuencias CRISPR (*PcasABCDEI2-CRISPR*) y evaluamos su expresión. Observamos actividad CAT en la fusión *PcasABCDEI2-CRISPR*; sin embargo, la expresión fue 10 veces menor respecto a la fusión que contiene solo el promotor de *casA*. Esta evidencia sugiere elementos de regulación transcripcional que actúan en la región intragénica del operón CRISPR/Cas.

Para definir regulación transcripcional por elementos intrínsecos del operón *casABCDEI2-CRISPR*, en una cepa de *S. Typhi* silvestre y una Δ CRISPR/Cas, evaluamos la expresión de diferentes fusiones transcripcionales, conteniendo el promotor de *casA* más un número variable de nucleótidos hacia la región intragénica 3' del operón. Las fusiones evaluadas en la cepa silvestre, las cuales contienen el promotor de *casA* más diferentes fragmentos de la región codificante de este gen, presentaron disminución en la actividad transcripcional, revelando la presencia de zonas de regulación negativa en la región intragénica de *casA*. Estas mismas fusiones fueron evaluadas en la cepa *S. Typhi* Δ CRISPR/Cas; observamos en todos los casos que la actividad transcripcional aumentó 33% respecto a la cepa silvestre, esta evidencia indica que existen elementos genéticos codificados dentro del sistema CRISPR/Cas capaces de modular parcialmente su propia transcripción. Una fusión más fue evaluada, esta contiene el promotor de *casA* hasta el nucleótido +181 respecto al ATG del segundo gen del operón (*casB*), en esta fusión la actividad transcripcional se restablece. Este fenómeno de disminución y aumento de actividad podría estar mediado por los RNAs antisentido para el sistema CRISPR/Cas, descritos en este trabajo. Los RNAs antisentido pueden operar de diversas maneras en las bacterias, actuado como finos moduladores de la expresión génica, algunos mecanismos son: interferencia, atenuación, estabilización del mensajero, protección de RNAs, represión en la traducción y como señal de degradación del mensajero (Sesto *et al.*, 2013). En este sentido, es probable que los niveles de transcripción del operón sean constantes en MM-N y que la regulación dada por RNAs antisentido sea postranscripcional, de tal manera un RNA mensajero corto o incompleto, generado en nuestras fusiones transcripcionales, podría ser degradado en mayor o menor medida, afectando la

traducción del gen reportero. Por otro lado el aumento de actividad en la fusión que comprende del promotor de *casA* a *casB* puede deberse a la presencia del promotor *casB*+142/+181 en esta fusión; sin embargo, la fuerza de este promotor es débil, por lo cual su contribución sería parcial y tendrían que existir más elementos o factores que induzcan los niveles de actividad observados. Es claro que el operón *casABCE12*-CRISPR es regulado por diferentes mecanismos y la participación de RNAs antisentido en la regulación fina del operón explicaría la expresión diferencial de los genes *cas*, optimizando los requerimientos para formar el complejo CASCADA del sistema CRISPR/Cas. Este complejo CASCADA se compone por: una proteína de CasA; dos de CasB, seis de CasC; una proteína de CasD y una de CasE. Uno de los RNAs antisentido definimos en este trabajo es sintetizado desde el nucleótido +154 respecto al ATG de *casB* hasta el nucleótido -56 respecto al ATG de *casA* (*casB*+153/*casA*-56) (Fig. 12, A). Es posible que este RNA antisentido sea el responsable de la atenuación de *casA*. De acuerdo a la evidencia obtenida, existe también un RNA antisentido transcrito desde *casI* hasta *casC* y uno más entre los nucleótidos +177 y -212 respecto al ATG de *cas2* (cadena complementaria), los cuales podrían contribuir a la expresión diferencial de los genes *casCDE12* actuando como atenuadores de transcripción.

La atenuación ocurre cuando un mRNA forma una estructura secundaria, esta puede ser debido a la interacción con un RNA antisentido, lo cual impide la elongación de la RNA polimerasa promoviendo la terminación temprana de la transcripción. Un ejemplo de atenuación se ejemplifica con el operón *fatDCBA-angRT* de *Vibrio anguillarum*. Este operón se compone de los genes *fatDCBA* que codifican proteínas transportadoras de sideróforos férricos y los genes involucrados en la biosíntesis sideróforos *angRT*. Aunque los genes *fatDCBA-angRT* se transcriben como operón, el nivel de expresión del mRNA de *fatDCBA* es 17 veces más alto que el mensajero completo *fatDCBA-angRT*. Esta expresión diferencial esta mediada por RNA β , un RNA antisentido de 427 nt que sobrelapa con la región UTR 3' de *fatA* y 5' de *angR*. El antisentido RNA β se une por complementariedad de bases al RNA mensajero policistrónico que se está transcribiendo e induce la terminación temprana, esto da como resultado un mRNA incompleto, que contiene solo transcritos los genes *fatDCBA* y por consiguiente la atenuación transcripcional de los genes *angRT*.

De acuerdo a nuestros resultados, sugerimos que los RNAs antisentidos del sistema CRISPR/Cas en *S. Typhi* tienen un papel en la regulación de la expresión diferencial de los genes *cas* para el funcionamiento óptimo del sistema. Es relevante para la continuación de este

proyecto caracterizar los RNA antisentidos presentes en el locus CRISPR/Cas de *S. Typhi*, así como demostrar su papel funcional sobre la expresión del operón *casABCDEI2*-CRISPR. La regulación transcripcional mediada por RNAs antisentido no ha sido reportada para los sistemas CRISPR/Cas de procariontes conocidos, por lo cual, las cimientos establecidas en este proyecto abren el campo a nuevas investigaciones sobre los mecanismos de regulación genética presentadas en el sistema CRISPR/Cas.

Parte importante de este trabajo fue investigar en qué momento del ciclo de vida de *Salmonella* se expresa el sistema CIRSPR/Cas de *S. Typhi*. Fue interesante observar que la expresión de este operón se da de manera natural en MM-N, este medio simula las condiciones intracelulares de macrófago de humano (Faucher *et al.*, 2005). Sin embargo, no podemos afirmar que el sistema funciona en esta etapa del ciclo de vida de *Salmonella*, debido a que la expresión inicial de 2 000 unidades CAT del promotor de *casA* es atenuada a 200 unidades al final del transcrito, sugiriendo dos posibilidades: la primera es que el sistema tenga una función biológica en esta condición y la segunda consistiría en la represión el sistema mediante diferentes mecanismos en esta condición, tales como atenuación por RNAs antisentido y factores proteicos como H-NS y LRP. También, en el presente trabajo definimos un RNA no codificable que se expresa a partir del promotor *casB*+142/+181, el cual se activa dependiendo del pH (Fig. 18-20). Esta unidad comprende 40 pb de la región de *casB* (nucleótidos +142/+181 respecto al ATG de *casB*). Mediante fusiones transcripcionales, determinamos que este transcrito no se expresa después del nucleótido +202. Como se mencionó anteriormente, la presencia de “small RNAs” funcionales se ha observado en el locus CRISPR/Cas de *Francisella novicida*, este patógeno al invadir el intestino delgado del humano induce la expresión del “small RNA” y en conjunto con Cas9 y el tracrRNA modulan negativamente la expresión de la lipoproteína antigénica. En la vía de infección *S. Typhi* se encuentra en el intestino delgado, en este compartimento la bacteria se enfrenta a condiciones de pH alcalino 7.5 (Evans *et al.*, 1988), es probable que el *PcasB*+142/+181 se exprese en esta fase de infección.

Hasta ahora no se ha estudiado si el sistema CRISPR/Cas tiene un papel biológico en alguna etapa del ciclo vital de *S. Typhi*. Sin embargo, en este proyecto, se determinó la expresión del operón *casABCDEI2*-CRISPR en MM-N, condición que simula el ambiente intracelular de macrófago (Deiwick *et al.*, 1999). Además, se ha detectado la expresión de *casC* en macrófagos de humano (Faucher *et al.*, 2005). Por esta razón es importante evaluar si

el “cluster” CRISPR/Cas tiene un papel en la invasión y replicación de *S. Typhi* en macrófagos de humano. Además, debido a que el sistema se expresa en pH 7.5, es importante determinar si una cepa de *S. Typhi* Δ CRISPR/Cas, es capaz de colonizar el intestino (ambiente con pH 7.5) en un modelo murino.

En *E. coli* el operón CRISPR/Cas se encuentra apagado, sin embargo, se ha demostrado su funcionalidad, al sobreexpresar el “cluster” CRISPR/Cas, *E. coli* aumenta su protección contra la infección de fago Lambda (Westra *et al.*, 2011). En *S. Typhi* no se ha evaluado si este conjunto genético provee protección contra elementos genéticos móviles, tales como plásmidos y DNA viral. Establecer si este mecanismo funciona biológicamente protegiendo a la bacteria contra el ataque de bacteriófagos, nos ayudará a entender cuando y donde se podría expresar el sistema CRISPR/Cas en *S. Typhi*.

CONCLUSIONES

- Mediante RT-PCR y fusiones transcripcionales demostramos que el sistema CRISPR/Cas se expresa como operón (*casABCDE12*-CRISPR) en MM-N, lo anterior a partir del promotor del gen *casA*.
- Delimitamos nuevas zonas de regulación negativa dentro de la región codificante de *casA*, entre los nucleótidos +191/+1779 respecto a su ATG.
- Por medio de fusiones transcripcionales definimos un promotor en la región codificante de *casB* (*PcasB*+142/+181), el cual se expresa MM-N pH 7.5. Sin embargo, *casB* origina una proteína independiente del promotor *PcasB*+142/+181.
- Mediante RT-PCR demostramos la presencia RNAs antisentidos, sintetizados en la hebra complementaria, de la región codificante del operón CRISPR/Cas. Reportamos el inicio de transcripción de un RNA antisentido ubicado a 153 pb río abajo del ATG de *casB*, así como su longitud aproximada de 2 117 nt. Este RNA antisentido muestra una expresión más alta en MM-N pH 7.5.
- El sistema CRISPR/Cas se autorregula negativamente, probablemente a través de RNAs antisentido reportados en este mismo estudio.

LITERATURA CITADA

- Ailion, M., Bobik, T. A. and Roth, J. R. (1993) Two global regulatory systems (Crp and Arc) control the cobalamin/propanediol regulon of *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol* 175:7200-7208.
- Ansai, S. and Kinoshita, M. (2014) Targeted mutagenesis using CRISPR/Cas system in medaka. *Biol Open* 3:362-71.
- Bakowski, M. A., Braun, V. and Brumell, J. H. (2008) *Salmonella*-Containing Vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic* 9:2022-2031.
- Bang, I. S., Audia, J. P., Park, Y. K. and Foster, J. W. (2002) Autoinduction of the *ompR* response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance response. *Mol Microbiol* 44:1235-1250.
- Bang, I. S., Kim, B.H., Foster, J.W. and Park, Y.K. (2000) OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 182: 2245-2252.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. and Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315:1709-1712.
- Barrangou, R. and Marraffini, L. A. (2014) CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell* 54:234-44.
- Bäumlner, A. J., Tsolis, R. M., Ficht, T. A. and Adams L. G. (1998). Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infec Immun* 6:4579-4587.
- Behlau, I. and Miller, S. J. (1993) A PhoP-repressed gene promotes *Salmonella* Typhimurium invasion of epithelial cells. *Bacteriol* 175:4475-84.
- Beuzon, C. R. and Holden, D. W. (2001) Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions in vivo. *Microb Infect* 3:1245-1352.
- Bikard, D., Jiang, W., Samai, P., Hochschild, A., Zhang, F. and Marraffini, L. A. (2013) Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res* 41:7429-7437.
- 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.
- Bowe, F., Lipps, C. J., Tsolis, R. M., Groisman, E., Heffron, F. and Kusters, J. G. (1998) At least four percent of the *Salmonella* Typhimurium genome is required for fatal infection of mice. *Infec Immun* 66:3372-3377.
- 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.
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R. and Swaminathan. (2000) *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol* 38:2465-2467.
- Brouns, S. J., Matthijs, M. J., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A., Dickman, M., Marakova, K., Koonin, E. and Van der Oost, J. (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321:960-963.

- Brumell, J. H. and Grinstein, S. (2004) *Salmonella* redirects phagosomal maturation. *Curr Opin Microbiol* 7:78-84.
- Calva, E., Puente, J. L. and Calva, J. J. (1988) Research opportunities in typhoid fever: epidemiology and molecular biology. *Bioessays* 9:173-177.
- Chatfield, S. N., Dorman, C. J., Hayward, C. and Dougan, G. (1991) Role of *ompR*-dependent genes in *Salmonella* Typhimurium virulence: mutants deficient in both *ompC* and *ompF* are attenuated in vivo. *Infect Immun* 59:449-452.
- Chen, H. D. and Groisman, E. A. (2013) The biology of the PmrA/PmrB two-component system: the major regulator of lipopolysaccharide modifications. *Annu Rev Microbiol* 67:83-112.
- Chen, P., Andersson, D. I. and Roth, J. R. (1994) The control region of the pdu/cob regulon in *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol* 176:5474-5482.
- 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.
- Coburn, B., Grassl, G. A. and Finlay, B. B. (2007) *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol* 85:112-118.
- Coburn, B., Li Y., Owen, D., Vallance, B. A. and Finlay, B. B. (2005) *Salmonella* enterica serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* 73:3219-3227.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. and Zhang, F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339:819-823.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. and Zhang, F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339:819-823.
- Contreras, I., Cecilia, S., Gonzalo, T. T. and Guido, C. M. (1997) *Salmonella* Typhi mutants defective in anaerobic respiration are impaired in their ability to replicate within epithelial cells. *Microbiology* 143:2665-2672.
- Crump, J. A., Luby, S. P. and Mintz, E. D. (2004) The global burden of typhoid fever. *Bulletin WHO* 82:346-353.
- Csonka, L. N. (1988) Regulation of cytoplasmic proline levels in *Salmonella* Typhimurium: effect of osmotic stress on synthesis, degradation, and cellular retention of proline. *J Bacteriol* 170:2374-2378.
- Csonka, L. N., Ikeda, T. P., Fletcher, S. A. and Kustu, S. (1994) The accumulation of glutamate is necessary for optimal growth of *Salmonella* Typhimurium in media of high osmolality but not induction of the *proU* operon. *J Bacteriol* 176:6324-33.
- 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.
- Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S. and Hensel, M. (1999) Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol* 31:1759-1773.

- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J. and Charpentier, E. (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471:602-7.
- Deveau, H., Barrangou, R., Gerneau, J. E., Labonte, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D. A., Horvath, P. and Moineau, S. (2008) Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 190:1390-1400.
- 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.
- 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.
- Faucher, S. P., Curtiss, R. and Daigle, F. (2005) Selective capture of *Salmonella enterica* serovar Typhi genes expressed in macrophages that are absent from the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genome. *Infect Immun* 73:5217-5221.
- Figueroa, I. M. and Verdugo, A. (2005) Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Rev Lat Microbiol* 47:1-2.
- Foster, J. W., Park, Y. K., Bang, I. S., Karem, K., Betts, H., Hall, H. K. and Shaw, E. (1994) Regulatory circuits involved with pH regulated gene expression in *Salmonella* Typhimurium. *Microbiol* 140:341-352.
- 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.
- 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.
- Garmendía, 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.
- Georgellis, D., Kwon, O. and Lin, E. C. (2001) Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science* 292:2314-2316.
- Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S. and Qi, L. S. (2013) CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154:442-51
- Glynn, J. R. and Palmer, S. R. (1992) Incubation period, severity of disease, and infecting dose: evidence from a *Salmonella* outbreak. *Am J Epidemiol* 136:1369-1377.
- Graeme-Cook, K.A., May, G., Bremer, E. and Higgins, C. F. (1989) Osmotic regulation of porin expression: a role for DNA supercoiling. *Mol Microbiol* 3:1287-1294.
- Gunaratnam, P., Tobin, S., Seale, H., and McAnulty J. M. (2014) Infectious diseases in returned travellers, NSW, 2010-2011. *N S W Public Health Bull* 24:171-175.
- Gunn, J. S. (2008) The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol* 16:284-90.
- Gunn, J. S., Belden, W. J. and Miller, S. I. (1998) Identification of PhoP-PhoQ activated genes within a duplicated region of the *Salmonella* Typhimurium chromosome. *Microbiol Pat* 25:77-90.

- Guo, L., Lim, K. B., Gunn, J. S., Bainbridge, B., Darveau, R. p., Hackett, M. and Miller S. I. (1997) Regulation of Lipid A Modifications by *Salmonella* Typhimurium Virulence Genes *phoP-phoQ*. *Science* 276:250-253.
- Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F. and Nelson, K. E. (2005) A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol* 1:e60.
- Han D. and Krauss, G. (2009) Characterization of the endonuclease SSO2001 from *Sulfolobus solfataricus* P2. *FEBS Lett* 583:771-6.
- Hansen-Wester, I. and Hensel, M. (2001) *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microb Infect* 3:549-559.
- Haraga, A., Ohlson, M. B. and Miller, S. I. (2008) *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* 6:53-66.
- Hernández-Lucas, I., Gallego-Hernández, A. L., Encarnación, S., Fernández-Mora, M., Martínez-Batallar, A. G., Salgado, H., Oropeza, R. and Calva, E. (2008) The LysR-type transcriptional regulator LeuO controls the expression of several genes in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Bacteriol* 190:1658-1670.
- Hornick, R. B., Greisman, S. E., Woodward, T. E., DuPont, H. L., Dawkins, A. T. and Snyder, M. J. (1970) Typhoid fever: pathogenesis and immunologic control. *N Engl J Med* 283:686-69.
- House, D., Bishop, A., Parry C., Dougan, G. and Wain, J. (2001) Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Curr Opin Infect Dis* 14:573-578.
- Jakočiūnė, D., Bisgaard, M., Hervéb, G., Protaisb, J., Olsena, J. E. and Chemalyb, M. (2014) Effects of environmental conditions on growth and survival of *Salmonella* in pasteurized whole egg. *Int J Food Microbiol* 184:27-30.
- Jansen, R., Jan, D. A., van Embden, D. A., Gaastra, W. and Schouls, L. M. (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 43:1565-1575.
- Johnson, L., Horsman, S. R., Charron-Mazenod, L., Turnbull, A. L., Mulcahy, H., Surette, M. G. and Lewenza, S. (2013) Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol* 13:115.
- Jones, B. D. and Falkow, S. (1996) Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol* 14:533-61.
- Jones, C. L., Napier, B. A., Sampson, T. R., Llewellyn, A. C., Schroeder, M. R. and Weiss, D. S. (2012) Subversion of host recognition and defense systems by *Francisella* spp. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:383-404.
- Jones, C. L., Sampson, T. R., Nakaya, H. I., Pulendran, B. and Weiss, D. S. (2012) Repression of bacterial lipoprotein production by *Francisella novicida* facilitates evasion of innate immune recognition. *Cell Microbiol* 4:1531-1543.
- Kasap, C., Elemento, O. and Kapoor, T. M. (2014) DrugTargetSeqR: a genomics and CRISPR-Cas9 based method to analyze drug targets. *Nat Chem Biol* 10:626-628.
- Kawaji, H., Mizuno, T. and Mizushima, S. (1979) Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins O-8 and O-9 of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 140:843-847.

- Kim, S. I., Ryu, S. and Yoon, H. (2013) Roles of YehZ, a putative osmoprotectant transporter, in tempering growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Microbiol Biotechnol* 23:1560-1568.
- Knodler, L. A. and Steele-Mortimer, O. (2003) Taking possession: biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic* 4:587-99.
- Kuning, V., Sorek, R. and Hugenholtz, P. (2007) Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol* 8:R61.
- Labrie, S. J., Samson, J. E. and Moineau, S. (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol* 8:317-327.
- Le Minor, L. and Popoff, M. Y. (1987) Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int J System Bacteriol* 37:465-468.
- Lee, I. S., Slonczewski, J. L. and Foster, J. W. (1994) A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol* 176:1422-1426.
- Liévin-Le V. M. and Alain L. Servin. (2006) Peptides and microbiota microorganisms: mucins, antimicrobial against unwelcome intrusion of harmful the front line of enteric host defense. *Clin Microbiol Rev* 19:315-337.
- Lillestøl, R. K., Redder, P., Garrett, R. A. and Brugger, K. (2006) A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea* 2:59-72.
- Lu, S., Killoran, P. B., Fang, F. C. and Riley, L. W. (2002) The global regulator ArcA controls resistance to reactive nitrogen and oxygen intermediates in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Infect Immun* 70:451-461.
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I. and Koonin, E. V. (2006) A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct* 1:7.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Snir, S. and Eugene, V. Koonin. 2011. Defense islands in bacterial and Archaeal genomes and prediction of novel defense systems. *J Bacteriol* 193:6039-6056.
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P. B., Esvelt, K. M., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, L. and Church, G. M. (2013) CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol* 31:833-838.
- Malpica, R., Franco, B., Rodriguez, C., Kwon, O. and Georgellis, D. (2004) Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:13318-13323.
- Marraffini, L. A. and Sontheimer, E. J. (2008) CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 322:1843-1845.
- Marraffini, L. A. and Sontheimer, E. J., (2010) Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature* 463:568-571.
- Mayer, M. P. (1995) A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* 163:41-46.

- 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.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Griffin, P. M. and Tauxe, R. V. (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5:607-625.
- Medina-Aparicio, L., Rebollar-Flores, J. E., Gallego-Hernández, A. L., Vázquez, A., Olvera, L., Gutiérrez-Ríos, R. M., Calva, E. and Hernández-Lucas, I. (2011) The CRISPR/Cas immune system is an operon regulated by LeuO, H-NS, and leucine-responsive regulatory protein in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Bacteriol* 193:396–2407.
- Mick, E., Stern, A. and Sorek, R. (2013) Persisting anti-phage CRISPR immunity in multiple human gut microbiomes. *RNA Biol* 10:900-906.
- Mirza, S. H., Beeching, N. J. and Hart, C. A. (1996) Multi-drug resistant typhoid: a global problem. *J Med Microbiol* 44:317-319.
- Mogasale, V., Desai, S. N., Mogasale, V. V., Park, J. K., Ochiai, R. L. and Wierzba, T. F. (2014) Case fatality rate and length of hospital stay among patients with typhoid intestinal perforation in developing countries: a systematic literature review. *PLoS One* 9:e93784
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. and Soria, E. (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 60:174-182.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E. and Juez, G. (2000) Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 36:244-246.
- Nair, S. and Finkel S. E. (2004) Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *J Bacteriol* 186:4192-4198.
- Nystrom, T., Larsson, C. and Gustafsson, L. (1996) Bacterial defense against aging: role of the *Escherichia coli* ArcA regulator in gene expression, readjusted energy flux and survival during stasis. *EMBO J* 15:3219-3228.
- Ota, S., Hisano, Y., Ikawa, Y. and Kawahara, A. (2014) Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish. *Gen Cells* 19:555-564.
- Plagens, A., Tjaden, B., Hagemann, A., Randau, L. and Hensel, R. (2012) Characterization of the CRISPR/Cas subtype I-A system of the hyperthermophilic crenarchaeon *Thermoproteus tenax*. *J Bacteriol* 194:2491-500.
- Price, E. P., Smith, H., Huygens, F. and Giffard, P. M. (2007) High-resolution DNA melt curve analysis of the clustered regularly interspaced short palindromic repeat locus of *Campilobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 73:3431-3436.
- Price-Carter, M., Tingey, J., Bobik, T. A. and Roth, J. R. (2001) The alternative electron acceptor tetrathionate supports B12- dependent anaerobic growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on ethanolamine or 1, 2-propanediol. *J Bacteriol* 183:2463-2475.
- 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.

- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P. and Lim, W. A. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*.152: 1173-1183.
-
- Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R. P., Tukel, C., Akcelik, M. and Bäümle, A. J. (2006) Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect Immun* 74:19-27.
- Ramu, P., Tanskanen, R., Holmberg, M., Lähteenmäki, K., Korhonen, T. K. and Meri, S. (2007) The surface protease PgtE of *Salmonella enterica* affects complement activity by roteolytically cleaving C3b, C4b and C5. *FEBS Lett* 581:1716-1720.
- Rychlik, I. and Barrow, P. A. (2005) *Salmonella* stress management and its relevance to behavior during intestinal colonization and infection. *FEMS Microbiol Rev* 29:1021-1040.
- Sampson, T. R., Saroj, S. D., Llewellyn, A. C., Tzeng, Y. L. and Weiss, D. S. (2013) A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature* 497:254-257.
- Sanchez, S., Guzmán-Trampe, S., Ávalos, M., Ruiz, B., Rodríguez-Sanoja, R. and Jimenez-Estrada, M. (2012) Microbial Natural Products: Chemical Diversity. In: Natural products in chemical biology. Natanya Civjam (ed.). Chapter 3, John Wiley & Sons, Inc. pp. 65-108. ISBN: 9781118101179
- Sánchez-Martínez, L., Rodríguez-Zapata, M. and Garrido-Álvarez, E. (2002) Salmonellosis: fiebre tifoidea y otras infecciones por *Salmonella*. *Med* 8:3437-3444.
- Scherer, C. and Miller, S. (2001) Molecular pathogenesis of *Salmonella* in principles of bacterial pathogenesis. *Academic press USA* pp. 265-317.
- 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.
- Schouls, L. M., Reulen, S., Duim, B., Wagenaar, J. A., Willems, R. J., Dingle, K. E., Colles, F. M. and Van Embden, J. D. (2007) Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: strain diversity, host range, and recombination. *J Clin Microbiol* 41:3431-3436.
- Sharma, A. and Qadri, A. (2004) Vi polysaccharide of *Salmonella* Typhi targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17492-17497.
- Smurnyy, Y., Cai, M., Wu, H., McWhinnie, E., Tallarico, J. A., Yang, Y. and Feng, Y. (2014) DNA sequencing and CRISPR-Cas9 gene editing for target validation in mammalian cells. *Nat Chem Biol*10:623-625
- Sorek, R., Kunin, V. and Hugenholz, P. (2008) CRISPR-a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* 6:181-191.
- Stecher, B., Macpherson, A. J., Hapfelmeier, S., Kremer, M., Stallmach, T. and Hardt, W. D. (2005) Comparison of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in germ free mice and mice pretreated with streptomycin. *Infect Immun* 73:3228-41.

- 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.
- Strand, K. R., Sun, C., Li, T., Jenney, F. E., JrSchut, G. J. and Adams, M. W. (2010) Oxidative stress protection and the repair response to hydrogen peroxide in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and in related species. *Arch Microbiol* 192:447-59.
- Sutherland, L., Cairney, J., Elmore, M. J., Booth, I. R. and Higgins, C. F. (1986) Osmotic regulation of transcription: induction of the *proU* betaine transport gene is dependent on accumulation of intracellular potassium. *J Bacteriol* 168:805-814.
- Torres, R., Martin, M. C., Garcia, A., Cigudosa, J. C., Ramirez, J. C. and Rodriguez-Perales, S. (2014) Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun* 5:3964.
- Touchon, M. and Rocha, E. P. (2010) The small, slow and specialized CRISPR and anti-CRISPR of *Escherichia* and *Salmonella*. *PLoS One* 5:e11126.
- 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.
- Valdivia, R. H. and Falkow, S. (1996) Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella* Typhimurium acid inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol Microbiol* 22:367-378.
- van der Oost, J., Jore, M. M., Westra, E. R., Lundgren, M. and Brouns, S. J. (2009) CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem Sci* 34:401-407.
- van der Velden, A. W., Bäumlner, A. J., Tsohis, R. M. and Heffron, F. (1998) Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium in mice. *Infect Immun* 66:2803-2808.
- Veres, A., Bridget, S., Gosis, Ding, Q., Collins, R., Ragavendran, A., Brand, H., Erdin, S., Talkowski, M. E. and Musunuru, K. (2014). Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell Stem Cell* 15:27-30.
- Villarreal, J. M., Becerra-Lobato, N., Rebollar-Flores, J. E., Medina-Aparicio, L., Carbajal-Gómez, E., Zavala-García, M. L., Vázquez, A., Gutiérrez-Ríos, R. M., Olvera L., Encarnación, S., Martínez-Batallar, A. M., Calva, E. and Hernández-Lucas, I. (2014) The *Salmonella enterica* serovar Typhi *ltrR-ompR-ompC-ompF* gene are involved in resistance to the bile salt sodium deoxycholate and in bacterial transformation. *Mol Microbiol* 92:1005-1024.
- Williams. E., Lowe, T. M., Savas, J. and DiRuggiero, J. (2007) Microarray analysis of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* exposed to gamma irradiation. *Extremophiles* 11:19-29
- Yang, M., Zhang, L., Stevens, J. and Gibson, G. (2014) CRISPR/Cas9 mediated generation of stable chondrocyte cell lines with targeted gene knockouts; analysis of an aggrecan knockout cell line. *Bone* 69C:118-125.

- Zegans, M. E., Wagner, J. C., Cady, K. C., Murphy, D. M., Hammond, J. H. and O'Tolole, G. A. (2008) Interactions bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviours of *P. aeruginosa*. *J Bacteriol* 191:210-219.
- 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.
- Zhang, Y., Heidrich, N., Ampattu, B. J., Gunderson, C. W., Seifert, H. S., Schoen, C., Vogel, J. and Sontheimer, E. J. (2013) Processing-independent CRISPR RNAs limit natural transformation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Cell* 50:488-503.
- Zhang, C., Xiao, B., Jiang, Y., Zhao, Y., Li, Z., Gao, H., Ling, Y., Wei, J., Li, S., Lu, M., Su, X., Cui, H. and Yuana, J. (2014) Efficient editing of malaria parasite genome using the CRISPR/Cas9 system. *MBio* 5:e01414-14.
- Zhang, H., Zhang, J., Wei, P., Zhang, B., Gou, F., Feng, Z., Mao, Y., Yang, L., Zhang, H., Xu, N. and Zhu, J. K. (2014) The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *PLoS Biotech J* 12:797-807.
- Zhang, S., Santos R. L., Tsolis, R. M., Stender, S., Hardt, W. D., Bäuml, A. J. and Adams, L. G. (2002) The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect Immun* 70:3843-3855.
- Zhang, S., Kingsley, R. A., Santos, R. L., Andrews-Polymeris, H., Raffatellu, M., Figueiredo, J., Nunes, J., Tsolis, R. M., Adams, L. G. and Bäuml, A. J. (2003) Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infect Immun* 71:1-12.
- Zhang, X. L., Tsui, I. S., Yip, C. M., Fung, A. W., Wong, D. K., Dai, X., Yang, Y., Hackett, J. and Morris, C. (2000) *Salmonella enterica* serovar Typhi uses type IVB pili to enter human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 68:3067-73.