



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Caracterización de la regulación y papel en virulencia de genes regulados por HiID en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA

RUBICELI MANZO DURÁN

TUTOR PRINCIPAL:

DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN  
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO  
Instituto de Biotecnología, UNAM

DR. ENRIQUE MERINO PÉREZ  
Instituto de Biotecnología, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS. Noviembre, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

---

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

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Dr. Enrique Merino Pérez

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Presidente Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Secretario Dra. Cinthia Ernestina Núñez López

Vocal Dr. Mario Soberón Chávez

Vocal Dr. Tomás David López Díaz

Vocal Dr. José Antonio Ibarra García

Durante el desarrollo de esta tesis recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología ( No. de registro 551227), así como apoyo de proyectos PAPIIT-UNAM (IN205512 y IN203415) y de CONCACYT-CB (179071) para la realización de mi trabajo de investigación.

---

*Con todo mi amor a la persona que más admiro, por su fortaleza, inteligencia, amor y gentileza. Gracias por tu apoyo incondicional, tus consejos, por impulsarme para cumplir mis sueños y enseñarme a volar aún con el viento en contra. Gracias por ser mi ejemplo a seguir para toda la vida. Te dedico esta tesis:*

*Mamá*

---

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tíos Luz, Glafira, Estela, Alma, Manuel y Salvador, por su apoyo, cariño, comprensión y paciencia.

A mi prima Blanca, por el aprecio y apoyo incondicional.

A mis primos por los momentos de felicidad que me han brindado.

A Mariana, por ser uno de mis impulsos día a día, pero sobre todo por tu amor y toda la alegría que me das.

A la familia Gallardo Tamayo por ser mi familia, no de sangre, pero si de corazón.

A Adán, por apoyarme, por ser paciente y tener fé en mí.

A mis amigos Maritere, Magdalena, Emma, Deyanira, Coral, Esbeydi, Maricruz, Alfonso, Diego, Crispin, Carlos y Jahir, por su cariño, paciencia y por siempre tener las palabras adecuadas en los momentos de alegría y tristeza.

A Roberto, por confiar siempre en mí, por impulsarme cada día a ser mejor y por apoyarme en todo momento.

Al Dr. Víctor Bustamante por darme la oportunidad y la confianza de realizar este proyecto. Por su paciencia, apoyo, consejos y disponibilidad para transmitirme su conocimiento científico.

Al Dr. José Luis Puente por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo, por sus consejos y comentarios hacia mi trabajo.

Al Dr. Edmundo Calva por su apoyo en mi formación académica.

A mis compañeros de laboratorio, por sus valiosos consejos, su ayuda incondicional, pero sobre todo por el cariño y la amistad que nos une.

A la señora Rebeca por hacerme sentir como en casa, por su cariño, su amistad y su valioso trabajo.

A Mario, por su labor, la cuál fue esencial para lograr este objetivo, pero también por su cariño y su alegría.

A la Dra. Guadalupe Espín y al Dr. Enrique Merino por formar parte de mi comité tutorial. Me dieron valiosos consejos para un mejor desarrollo de este proyecto, así también, sugerencias que me hicieron crecer como estudiante de posgrado.

A los miembros de mi jurado de tesis, Dra. Cinthia Núñez, Dr. Guillermo Gosset, Dr. Mario Soberón, Dr. Tomás López y Dr. José Antonio Ibarra por su tiempo y sus comentarios hacia mi tesis.

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

a.a.	Aminoácidos
Amp	Ampicilina
ATR	Respuesta adaptativa de tolerancia ácida
C	Citosina
°C	Grados Celsius
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
cbp	Cuanto baste para
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EMSA	Ensayo de retardamiento en gel de la movilidad electroforética
G	Guanina
HTH	Hélice-giro-hélice
Ig	Inmunoglobulina
kb	Kilobase
kDa	Kilodaltones
Km	Kanamicina
kV	Kilovoltios
lb	Libras
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mg	Miligramo

---

min	Minutos
μL	Microlitro
mL	Mililitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
MM-N	Medio mínimo N
MQ	Milli-Q
ms	Milisegundo
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco abierto de lectura
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos salinos
PBS-T	Amortiguador de fosfatos salinos con Tween
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SCV	Vacuolas que contienen a <i>Salmonella</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SET	Sacarosa EDTA Tris
SIFs	Filamentos inducidos por <i>Salmonella</i>

---

SOC	Caldo super óptimo con represión catabólica
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
SST3	Sistema de secreción tipo tres
Str	Estreptomicina
TDTT	Tris ditiotreitól
U	Unidad
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VAP	Vacuolas asociadas a la polimerización de actina
WT	Cepa silvestre

---

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. El género <i>Salmonella</i> y su importancia epidemiológica.....	14
1.2. Factores de virulencia de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	15
1.2.1. Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i> .....	15
1.2.1.1. SPI-1.....	15
1.2.1.2. SPI-2.....	16
1.2.2. Sistema de secreción tipo III.....	17
1.3. Mecanismo de patogénesis.....	18
1.4. Regulación de los genes de SPI-1 y SPI-2.....	25
1.5. El regulador HilD.....	27
2. ANTECEDENTES.....	28
3. HIPÓTESIS.....	31
4. OBJETIVOS.....	31
4.1. General.....	31
4.2. Particulares.....	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
5.1. Construcción de las fusiones transcripcionales.....	36
5.2. Purificación de plásmidos.....	37
5.3. Preparación de células electrocompetentes.....	37
5.4. Electroporación.....	37
5.5. Cultivos bacterianos para cuantificar la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 .....	38
5.6. Cuantificación de la actividad enzimática específica de CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa).....	39
5.7. Construcción de cepas mutantes.....	39

---

5.8.	Perfil de proteínas secretadas.....	41
5.9.	Inmunodetección de proteínas mediante “Western blot”.....	41
5.10.	Transducción utilizando el fago P22.....	42
5.11.	Ensayos de retardamiento en gel (EMSA’s <u>E</u> lectrophoretic <u>M</u> obility <u>S</u> hift <u>A</u> ssays) con DNA.....	43
5.12.	Ensayo de invasión a células epiteliales.....	44
6.	RESULTADOS.....	45
6.1.	HilD regula positivamente la expresión de los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> y <i>SL2438</i> cuando se crece a <i>S. Typhimurium</i> en medio LB.....	45
6.2.	HilD regula la expresión de los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> y <i>SL2438</i> de manera indirecta.....	51
6.3.	HilD, pero no HilA o InvF regula positivamente la expresión de los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> y <i>SL2438</i> .....	54
6.4.	La expresión de los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> , <i>SL2438</i> y <i>SL1263</i> se induce en medio MM-N.....	55
6.5.	La regulación de los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> , <i>SL2438</i> y <i>SL1263</i> es independiente de HilD en MM-N.....	58
6.6.	La regulación de los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> , <i>SL2438</i> y <i>SL1263</i> es independiente de SsrA/B.....	60
6.7.	Los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> y <i>SL2438</i> no forman parte del SST3 de SPI-1.....	62
6.8.	Los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> y <i>SL2438</i> se requieren para la invasión a células epiteliales.....	63
7.	DISCUSIÓN.....	64
8.	CONCLUSIONES.....	68
9.	PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.....	69
10.	APÉNDICE.....	69
10.1.	Medios de cultivo empleados.....	69
10.2.	Reactivos empleados para Western blot.....	71

10.3. Reactivos empleados para el ensayo de invasión a células epiteliales.....	72
11. REFERENCIAS.....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de SPI-1.....	16
<b>Figura 2.</b> Estructura de SPI-2.....	17
<b>Figura 3.</b> Estructura del SST3.....	18
<b>Figura 4.</b> Modelo de patogénesis de <i>Salmonella enterica</i> .....	20
<b>Figura 5.</b> Regulación de SPI-1 partiendo de la activación de HilD.....	26
<b>Figura 6.</b> Regulación de SPI-2 partiendo de la activación de SsrA/B.....	27
<b>Figura 7.</b> Regulón de HilD.....	28
<b>Figura 8.</b> Contexto genómico de los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> , <i>SL2438</i> y <i>SL1263</i> .....	30
<b>Figura 9.</b> HilD regula positivamente la expresión de los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> y <i>SL2438</i> cuando se crece a <i>S. Typhimurium</i> en medio LB.....	48
<b>Figura 10.</b> La expresión de HilD a partir del plásmido pK6-HilD restaura la expresión de los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> y <i>SL2438</i> en la cepa $\Delta hilD$ .....	49
<b>Figura 11.</b> Perfil de proteínas secretadas de la cepa de <i>S. Typhimurium</i> WT y de sus derivadas mutantes $\Delta hilD$ <i>SL1770::3XFLAG</i> , $\Delta hilD$ <i>SL1872::3XFLAG</i> y $\Delta hilD$ <i>SL2438::3XFLAG</i> .....	50
<b>Figura 12.</b> La expresión de las proteínas <i>SL1770-FLAG</i> y <i>SL1872-FLAG</i> se disminuye en la cepa $\Delta hilD$ cuando se crece a <i>S. Typhimurium</i> en LB.....	50

---

<b>Figura 13.</b> La expresión de HilD no induce la expresión de las fusiones <i>SL1770-cat</i> , <i>SL1872-cat</i> y <i>SL2438-cat</i> en <i>E. coli</i> K12.....	52
<b>Figura 14.</b> HilD no interactúa con la región reguladora de los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> y <i>SL2438</i> .....	53
<b>Figura 15.</b> HilD no regula la expresión de los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> y <i>SL2438</i> a través de HilA o InvF en medio LB.....	55
<b>Figura 16.</b> Expresión diferencial de los genes <i>invF</i> (SPI-1) y <i>ssaG</i> (SPI-2) en LB y MM-N.....	56
<b>Figura 17.</b> La expresión de los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> , <i>SL2438</i> y <i>SL1263</i> se induce en medio MM-N.....	57
<b>Figura 18.</b> La regulación de los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> , <i>SL2438</i> y <i>SL1263</i> en MM-N es independiente de HilD.....	59
<b>Figura 19.</b> La expresión de los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> , <i>SL2438</i> y <i>SL1263</i> es independiente de SsrA/B.....	61
<b>Figura 20.</b> Los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> y <i>SL2438</i> no se requieren para el perfil de secreción de proteínas típico de SPI-1.....	62
<b>Figura 21.</b> Los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> y <i>SL2438</i> se requieren para la invasión de <i>S. Typhimurium</i> a células HeLa.....	63
<b>Figura 22.</b> Modelo propuesto de regulación de la expresión de las proteínas <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> , <i>SL2438</i> y <i>SL1263</i> .....	66

---

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Localización, blancos y función de proteínas efectoras secretadas por el SST3-1 y SST3-2.....	21
<b>Tabla 2.</b> Características de los genes <i>SL1770</i> , <i>SL1872</i> , <i>SL2438</i> y <i>SL1263</i> .....	29
<b>Tabla 3.</b> Antibióticos y dosis empleadas .....	31
<b>Tabla 4.</b> Cepas bacterianas.....	32
<b>Tabla 5.</b> Plásmidos utilizados.....	33
<b>Tabla 6.</b> Oligonucleótidos empleados.....	34
<b>Tabla 7.</b> Mezclas para llevar a cabo la transducción de las proteínas etiquetadas con FLAG de la cepa <i>S. Typhimurium</i> WT a la $\Delta hilD$ .....	43
<b>Tabla 8.</b> Resultados del análisis de transcriptoma de la cepa de <i>S. Typhimurium</i> SL1344 WT, por medio de microarreglos, a partir de bacterias dentro de macrófagos.....	73

---

## RESUMEN

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) es una bacteria patógena que causa enteritis severa en humanos y en diferentes animales, e infección sistémica en ratones y pollos. La mayoría de los genes de virulencia de *Salmonella* se localizan en regiones del genoma denominadas Islas de Patogenicidad de *Salmonella* (SPIs por sus siglas en inglés). SPI-1 codifica un Sistema de Secreción Tipo III (SST3), diferentes proteínas efectoras y sus respectivas chaperonas, así como reguladores transcripcionales que controlan la expresión de los genes de esta isla. Estas proteínas efectoras son translocadas de la bacteria al citoplasma de las células epiteliales del intestino del hospedero, a través del SST3, el cual permite a *Salmonella* la invasión del epitelio intestinal, causando enteritis. Los genes de SPI-1 se expresan *in vivo* cuando *Salmonella* se encuentra en el intestino de sus hospederos e *in vitro* cuando se crece en el medio rico en nutrientes Luria-Bertani (LB). HilD es un miembro de la familia de reguladores transcripcionales AraC, codificado en SPI-1, el cual induce la expresión de los genes codificados en esta isla, así como la de otros genes fuera de SPI-1. HilD induce directamente la expresión de HilA, de la familia de reguladores OmpR/ToxR, el cual estimula la expresión de InvF, otro miembro de la familia AraC. Recientemente, mediante un análisis transcriptómico comparativo de la cepa de *S. Typhimurium* silvestre y su respectiva mutante  $\Delta hilD$ , se encontraron 18 genes regulados por HilD, adicionales a los ya conocidos, los cuales codifican para proteínas hipotéticas. En este trabajo empezamos a caracterizar 4 de estos genes: *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263*. Mediante análisis de la expresión de estos genes en diferentes fondos genéticos, en presencia o no de HilD, así como con ensayos de interacción proteína-DNA, determinamos que HilD induce la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* de manera indirecta, cuando se crece a *S. Typhimurium* en LB. Además, demostramos que HilD regula a estos genes a través de un factor presente en *S. Typhimurium* pero no en *E. coli* K12, lo cual no involucra a los reguladores HilA e InvF. Interesantemente, nuestros resultados revelaron que la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* se induce cuando se crece a *S. Typhimurium* en el medio mínimo (MM-N), de manera independiente a HilD y al sistema de dos componentes SsrA/B, el cual regula la expresión de genes de virulencia de *Salmonella* en esta condición de crecimiento. Así, nuestros resultados indican que hay dos mecanismos que inducen la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438*, uno que se induce en LB, el cual es dependiente de HilD, y otro que actúa en MM-N de manera independiente a HilD. Por otro lado, determinamos que los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* se requieren para la invasión de *S. Typhimurium* a células HeLa, pero no para la secreción de proteínas efectoras de SPI-1. En conjunto, nuestros resultados incrementan el conocimiento acerca del regulón de HilD y de su papel en la virulencia de *S. Typhimurium*.

---

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. El género *Salmonella* y su importancia epidemiológica

La familia *Enterobacteriaceae* la constituyen bacterias Gram-negativas entre las que se encuentra el género *Salmonella* y *Escherichia*, entre otros. Las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* no forman esporas y tienen forma de bastón, su diámetro es de alrededor de 0.7 a 1.5 µm, con una longitud de 2 a 5 µm. Son bacterias anaerobias facultativas y presentan predominantemente motilidad peritrica. El género *Salmonella* se clasifica de acuerdo al esquema de Kauffmann-White en dos especies, *S. bongori* y *S. enterica*. *S. enterica* se puede dividir en seis subespecies *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV), y *S. enterica* subsp. *indica* (VI). Además, *S. enterica* se puede clasificar con base en el antígeno de superficie O (lipopolisacárido [LPS]) en 67 serogrupos y en 2 557 serotipos o serovariedades cuando se diferencian por los antígenos O y H (flagelar) (Fàbrega and Vila, 2013).

Diferentes serotipos de *Salmonella enterica* infectan a humanos y animales; estos pueden ocasionar desde infecciones intestinales localizadas, produciendo diarrea, hasta infecciones sistémicas severas, como fiebre tifoidea. Las infecciones causadas por *Salmonella* dependen del serotipo involucrado y del hospedero. En humanos, los serotipos Typhi y Paratyphi ocasionan fiebre tifoidea y paratifoidea, respectivamente; mientras que los serotipos Typhimurium y Enteritidis causan diarrea comúnmente conocida como salmonelosis (Haraga *et al.*, 2008).

La fiebre tifoidea y paratifoidea son enfermedades sistémicas que afectan a humanos. Los síntomas son fiebre, dolor de cabeza, dolor abdominal y diarrea o estreñimiento. Daña órganos como son hígado y bazo. La mortalidad de la fiebre tifoidea es del 10-20% sin tratamiento, disminuyendo a <1% cuando la infección es tratada con los antibióticos adecuados (Parry *et al.*, 2002). La OMS reporta 17 millones de casos de fiebre tifoidea cada año alrededor del mundo. Por otro lado, la salmonelosis es una infección que permanece localizada en el intestino y nodos linfáticos. Los síntomas son fiebre, dolor abdominal, calambres, inflamación del intestino grueso, diarrea con o sin sangre, náuseas y vómito. La mayoría de los casos graves terminan en septicemia (Coburn *et al.*, 2007). La OMS reporta 10 millones de casos en humanos cada año alrededor del mundo.

Hay serotipos específicos de un hospedero, como Typhi y Paratyphi, los cuales infectan sólo a humanos, y serotipos que infectan a varios hospederos, como Typhimurium, el cual afecta tanto a humanos como a diversos animales. *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*) puede ocasionar los dos tipos de infección, dependiendo de su hospedero. Debido a esto, se ha

---

empleado como modelo para el estudio de los mecanismos moleculares por medio de los cuales *Salmonella* interactúa con las células del hospedador (Haraga *et al.*, 2008; Fàbrega and Vila, 2013).

## **1.2. Factores de virulencia de *Salmonella* Typhimurium**

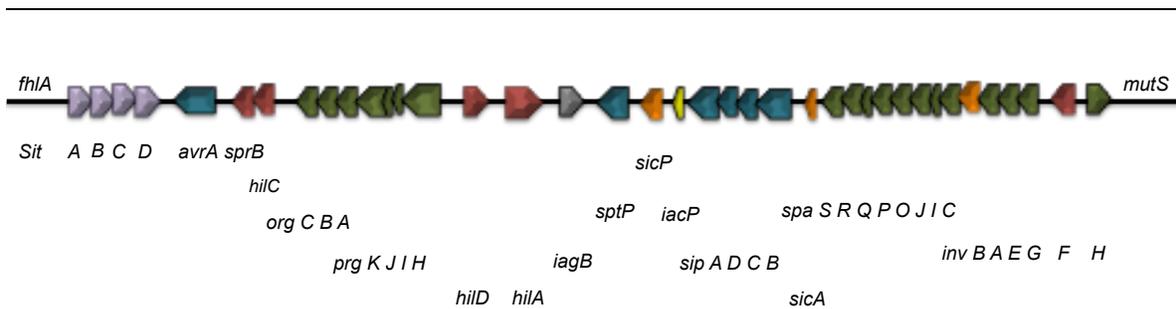
La trascendencia de la salmonelosis está determinada por los factores de virulencia empleados por la bacteria para interactuar y evadir la respuesta inmune del hospedero, la cual depende del estado de salud del mismo. Los factores de virulencia comprenden adhesinas, flagelo, componentes esenciales para la formación del biofilm y proteínas que constituyen el Sistema de Secreción Tipo 3 o se secretan a través de éste. Los genes que codifican para los factores de virulencia se localizan en el cromosoma o en el plásmido de virulencia pSLT (Marcus *et al.*, 2000; Coburn *et al.*, 2007).

### **1.2.1. Islas de patogenicidad de *Salmonella***

*S. Typhimurium* tiene alrededor de 1400 genes que no se encuentran en *E. coli* K12, la mayoría de estos están localizados en regiones particulares del genoma conocidas como islas, las cuales se propone que fueron adquiridas mediante transferencia horizontal. A las islas que contienen genes definidos como importantes en la virulencia se les denomina islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs, por "*Salmonella* Pathogenicity Islands") (Haraga *et al.*, 2008; Fàbrega and Vila, 2013). SPI-1 y SPI-2 (Figura 1 y 2) son las islas mejor caracterizadas y son esenciales para la virulencia de *Salmonella* (Fàbrega and Vila, 2013).

#### **1.2.1.1. SPI-1**

La isla de patogenicidad 1 se localiza en todos los miembros del género *Salmonella*. Es una de las islas mejor caracterizadas, se ubica a 63 centisomas del cromosoma, consta de 39 genes y tiene un tamaño de 40 kb; su contenido de GC es de 42%, menor al del cromosoma de *Salmonella*, que consta del 52%. SPI-1 está flanqueada por los genes *fhIA* y *mutS* (Figura 1) (Collazo *et al.*, 1997; Hensel, 2004; Ochman *et al.*, 1996). Los genes que forman parte de esta isla codifican para proteínas que constituyen un sistema de secreción tipo 3 (SST3), como los operones *org*, *prg*, *spa* e *inv* (excepto los genes *invB* e *invF*), para proteínas efectoras que se secretan a través del SST3, como los genes *avrA* (Avirulence factor A), *sptP* (*Salmonella* Protein Tyrosine Phosphatase) y el operón *sip* (*Salmonella* Invasion Protein); para chaperonas, como los genes *sicP*, *sicA* e *invB*, y para reguladores transcripcionales, como los genes *hilA*, *hilC*, *invF*, *sprB* y *hilD*. Adicionalmente, SPI-1 contiene al operón *sit* que codifica para un sistema de consumo de hierro, el cual no se requiere para la invasión; y el gen *iagB* de función desconocida (Marcus *et al.*, 2000, Fàbrega and Vila, 2013).



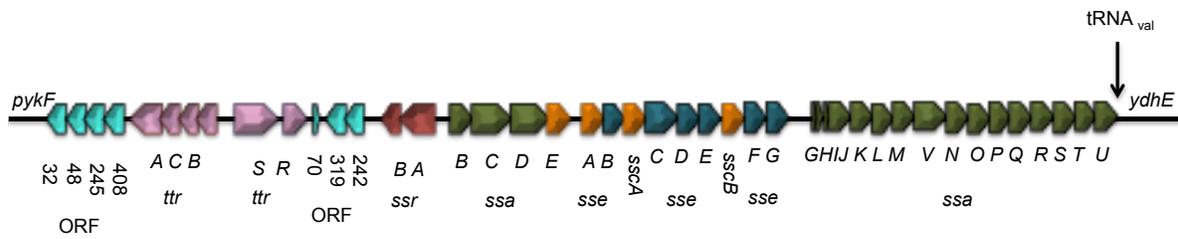
#### Función

	Sistema de consumo de hierro		Desconocida
	Proteína secretada		Chaperona
	Regulador transcripcional		Enzima citoplasmática
	Aparato de secreción		

Figura 1. Estructura de SPI-1. Se indica la localización de los genes codificados en esta isla de patogenicidad, así como su función y nomenclatura. Modificado de Collazo *et al.*, 1997; Marcus *et al.*, 2000 y Fàbrega and Vila, 2013.

#### 1.2.1.2. SPI-2

Esta isla se localiza en el centisoma 31 del genoma, contiene 44 genes y su tamaño es de alrededor de 40 kb. Una porción de 25 kb que codifica para el SST3 se encuentra únicamente en *Salmonella enterica* y su contenido de GC es de 43%. El fragmento restante de 15 kb se localiza en *Salmonella bongori* y *enterica*, tiene genes indispensables para la infección sistémica y codifica para la tetratonato reductasa, involucrada en la respiración anaeróbica, el contenido de GC de esta región es de 54%. Se han descrito cuatro tipos de genes, agrupados en cuatro operones. El operón *ssa* (genes que codifican el aparato del SST3, Secretion System Apparatus), el operón *ssr* (Secretion System Regulators), *ssc* (Secretion System Chaperones), y *sse* (Secretion System Effectors). También se localiza un grupo de cinco genes *ttr*, los cuales están involucrados en la reducción del tetratonato; además de siete marcos abiertos de lectura (ORF's) de función desconocida (Figura 2) (Hensel *et al.*, 1997; 1999a; 1999b).



### Función

	Tetraciónato reductasa		Desconocida
	Proteína secretada		Chaperona
	Regulador transcripcional		
	Aparato de secreción		

Figura 2. Estructura de SPI-2. Se indica la localización de los genes codificados en esta isla de patogenicidad, así como su función y nomenclatura. Modificado de Marcus *et al.*, 2000 y Fàbrega and Vila, 2013.

### 1.2.2. Sistema de Secreción Tipo III

El SST3 (Sistema de Secreción Tipo 3) es un complejo de alrededor de 20 proteínas que forman una jeringa molecular, a través de la cual la bacteria “inyecta” las proteínas efectoras al interior de las células del hospedero (Marcus *et al.*, 2000; Moest and Méresse, 2013). Es una estructura que comprende un cuerpo basal formando un inyectisoma, que se proyecta de la membrana externa de la bacteria hacia la del huésped; y a través de la cual se translocan las proteínas efectoras. El cuerpo basal consiste de un anillo interno, un cuello que se propaga de la zona periplásmica y un anillo externo. Para ser funcional, un SST3 requiere de elementos adicionales: un complejo regulador citosólico que está unido al cuerpo basal, una barra interna que constituye la base de la jeringa, y un translocón, que es un complejo de proteínas formadoras de un poro en la membrana de las células del hospedero, el cual está asociado a la punta de la jeringa que libera los efectores al citosol del huésped (Cornelis, 2006).

SPI-1 y SPI-2 de *Salmonella enterica* codifican cada una para un SST3 (Galán and Curtiss, 1989; Marcus *et al.*, 2000; Moest and Méresse, 2013; Ochman *et al.*, 1996). La estructura de ambos SST3 es la misma (Figura 3), lo que difiere es la condición de expresión y la función de las proteínas efectoras que se secretan a través de cada sistema. El SST3-1 (Sistema de secreción tipo 3 de SPI-1) es requerido para la infección intestinal, ya que a través de él se secretan proteínas efectoras que producen re-arreglos en el citoesqueleto de las células epiteliales del hospedero, lo cual permite que la bacteria se introduzca en ellas. El SST3-2 (Sistema de secreción tipo 3 de SPI-2) es necesario para establecer una infección

sistémica, debido a la translocación de proteínas efectoras que permiten a *Salmonella enterica* replicarse dentro de macrófagos y de las células de algunos órganos del huésped, principalmente hígado y bazo (Haraga *et al.*, 2008; Moest and Méresse, 2013). Sin embargo, se ha observado que ambos SST3 y algunas proteínas efectoras se expresan tanto en una enteritis como en una infección sistémica (Bispham *et al.*, 2001; Brawn *et al.*, 2007; Laughlin *et al.*, 2014).

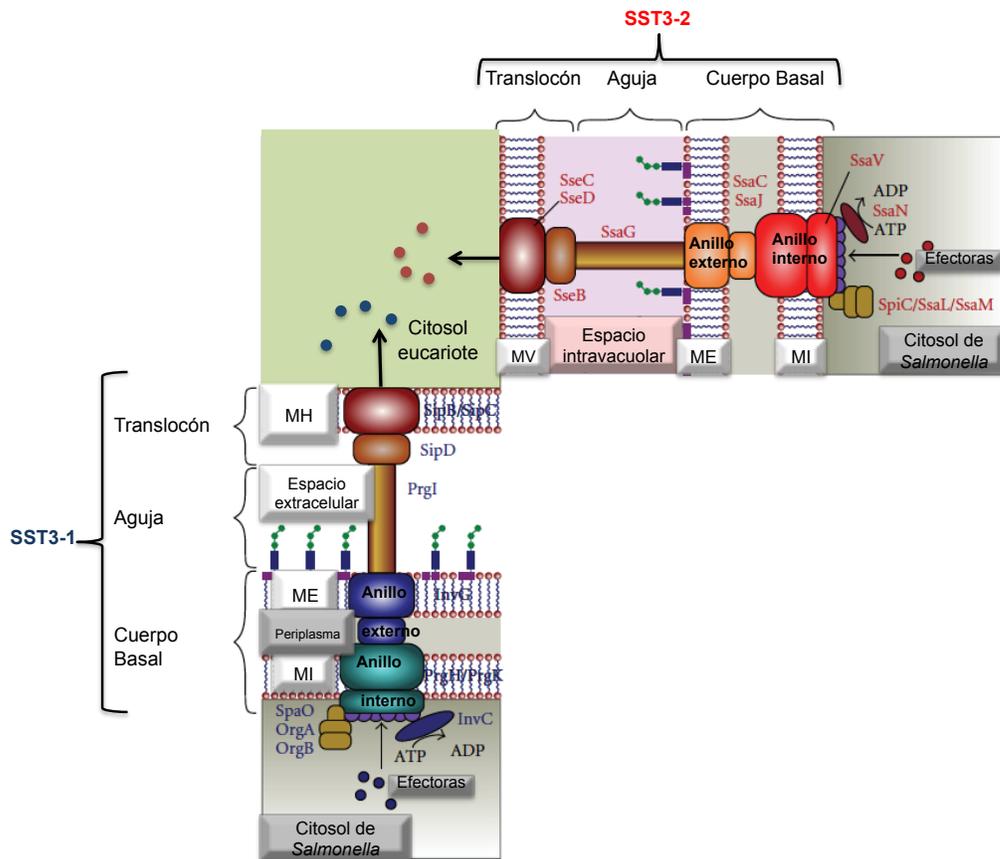


Figura 3. Estructura del SST3. Se indican las proteínas que forman el SST3-1 (azul) y el SST3-2 (rojo). Los círculos azules muestran las proteínas efectoras secretadas por el SST3-1 y los rojos las proteínas efectoras secretadas por el SST3-2. MV (Membrana vacuolar), ME (Membrana externa), MI (Membrana interna) y MH (Membrana plasmática del hospedero). Modificado de Ramos-Morales, 2012.

### 1.3. Mecanismo de patogénesis

*Salmonella* entra al hospedador por vía oral a través de agua y alimentos contaminados (Figura 4) (Haraga *et al.*, 2008). El primer obstáculo que enfrenta la bacteria es el pH ácido del estómago, el cual evade activando la respuesta adaptativa de tolerancia ácida (ATR, por sus siglas en inglés “Acid Tolerance Response”), que mantiene el pH más alto que el del entorno (Foster and Hall, 1991). Una vez que la bacteria llega al intestino delgado, atraviesa la capa de la

---

mucosa intestinal y evade la acción de enzimas digestivas, IgA secretora, péptidos antimicrobianos y otras respuestas del sistema inmune innato para tener acceso al epitelio subyacente (Haraga *et al.*, 2008). Después, la bacteria se adhiere a la superficie de las células epiteliales por medio de adhesinas. La bacteria entra al epitelio intestinal a través de las células M localizadas en las placas de Peyer, o invadiendo a los enterocitos (Jones *et al.*, 1994). Enseguida se activa la translocación de proteínas efectoras al citoplasma de las células del hospedero, a través del SST3-1, como son SipA, SipC, SopE, SopE2, SigD y SptP, las cuales modifican diversas rutas de transducción de señales y promueven cambios en el citoesqueleto (Tabla 1) (Ramos-Morales, 2012), lo cual permite la internalización de la bacteria a los enterocitos originando una infección intestinal. La restauración de la estructura de las células la lleva a cabo la proteína SptP, la cual es una proteína activadora de GTPasa (GAP) (Fu and Galán, 1999). También se disminuye la inflamación, donde los efectores SspH1 y AvrA inhiben la activación de NF- $\kappa$ B (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) (Tabla 1). Por otra parte, *Salmonella* puede diseminarse a cualquier tejido, ya que la bacteria es capaz de sobrevivir y replicarse dentro de macrófagos. Este proceso requiere del SST3-2 y de proteínas efectoras codificadas en SPI-2, las cuales se encargan de formar y mantener las SCV ("*Salmonella* Containing Vacuoles"), que son largas vesículas donde la bacteria se replica. Las SCV previenen la liberación de factores antimicrobianos en el hospedero (por ejemplo la formación de complejos de radicales libres) modificando la organización del citoesqueleto de los macrófagos y dañando el transporte vesicular (ver la tabla 1 para mayor información de las funciones de las proteínas efectoras) (Rajashekar *et al.*, 2008; Kuhle *et al.*, 2004; Uchiya *et al.*, 1999). Así, los genes de SPI-1 son necesarios principalmente para la invasión de *Salmonella* a los enterocitos, es decir, la colonización intestinal que origina los síntomas característicos de una enterocolitis; mientras que los genes de SPI-2 permiten su replicación dentro de macrófagos y, por lo tanto, su diseminación sistémica (Figura 4) (Haraga *et al.*, 2008; Fàbrega and Vila, 2013; Moest and Méresse, 2013). Aunque los genes de SPI-2 también tienen un papel en la infección intestinal, específicamente en el proceso de inflamación del intestino (Bispham *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2005).

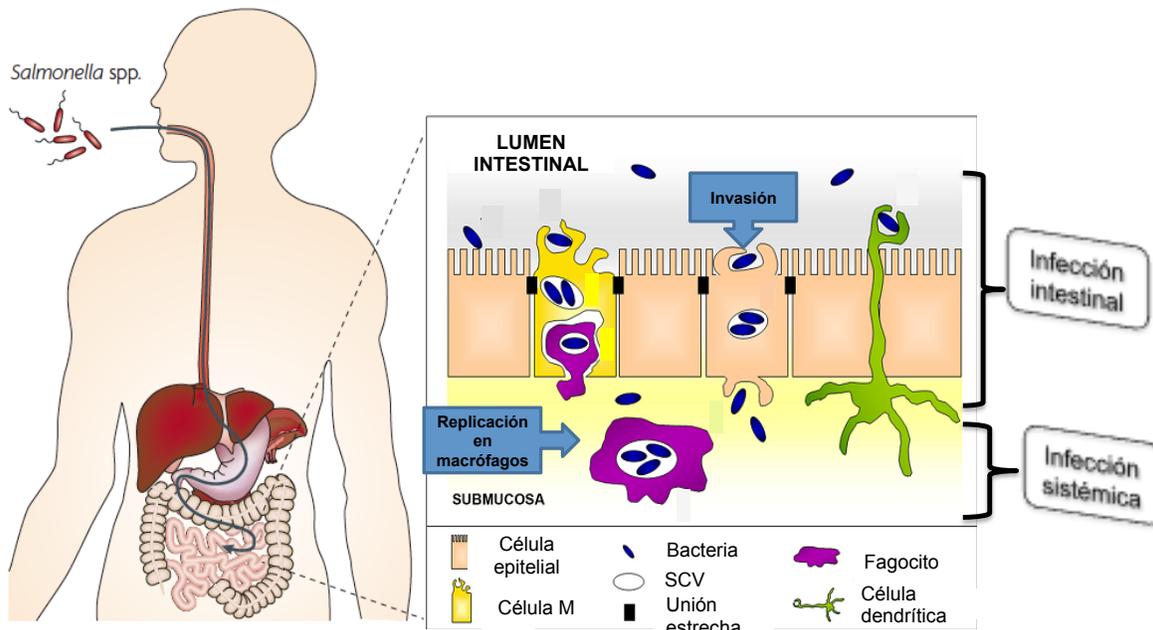


Figura 4. Modelo de patogénesis de *Salmonella enterica*. *Salmonella* entra al hospedero por vía oral a través de agua o alimentos contaminados. Una vez que la bacteria se localiza en el intestino delgado, expresa genes que codifican proteínas formadoras del SST3-1 y transloca a través de éste proteínas efectoras de su citoplasma al de los enterocitos de su hospedero, originando con esto rearrreglos en el citoesqueleto de las células epiteliales que van a internar a la bacteria, dando lugar a una infección de tipo intestinal. Otra vía de entrada es a través de las células dendríticas, de esta forma llegan más rápido a los macrófagos, donde se van a replicar y diseminar a los órganos del huésped, ocasionando una infección de tipo sistémica. Modificada de Haraga *et al.*, 2008 y Fàbrega and Vila, 2013.

**Tabla 1. Localización, blancos y función de proteínas efectoras secretadas por el SST3-1 y SST3-2**

Proteína efectora	Localización	Blancos conocidos	Función
<b>Secretadas por el SST3-1</b>			
AvrA	SPI-1	JNK, $\beta$ -catenina, ERK2, I $\kappa$ B $\alpha$ , MKK4, MKK7, p53	Acetiltransferasa. Deubiquitinasa. Inhibición de apoptosis en células epiteliales, inhibición de piroptosis en macrófagos. Antiinflamatorio
SipA	SPI-1	Caspasa-3, F-actina, T-plastina	Estabilización y localización de los filamentos de actina durante la invasión, estabilización de VAP, correcta localización de SifA, migración perinuclear y morfología de SCV
SipB	SPI-1	Caspasa-1	Adhesión a las células epiteliales, piroptosis temprana en macrófagos
SipC	SPI-1	Citoqueratina 8, citoqueratina 18, Exo70, F-actina, syntaxina 6	Adhesión a las células epiteliales, nucleación de la actina y maduración de SCV
SipD	SPI-1	Desconocido	Adhesión a las células epiteliales
SopA	Cromosoma	Caspasa-3, HsRMA1, UbcH7	Ubiquitin ligasa. Involucrada en la invasión y migración de las SCVs

SigD	SPI-5	RhoG Akt	Secreción de cloro, inducción de la respuesta proinflamatoria. Rearreglos de actina del citoesqueleto, invasión de las células epiteliales. Inhibición del tráfico vesicular, formación y determinación del tamaño de SCV. Inhibición de apoptosis en células epiteliales
SopE	Cromosoma	Cdc42, Rac-1, Rab-5	Rearreglos del citoesqueleto de actina, invasión de células epiteliales, inducción de la respuesta proinflamatoria
SopE2	Cromosoma	Cdc42, Rac-1	Rearreglos del citoesqueleto de actina, invasión de las células epiteliales, inducción de la respuesta proinflamatoria
SptP	SPI-1	Cdc42, Rac-1	Desorganización de la actina del citoesqueleto por antagonismo de SopE, SopE2 y SigD
SiiE	SPI-4	Desconocido	Adhesión a las células epiteliales
<b>Secretadas por el SST3-2</b>			
CigR	SPI-3	Desconocido	Contribuye a la replicación intracelular
GogB	Gifsy-1	FBXO22	Antiinflamatorio

PipB	SPI-5	Desconocido	Acumulación en balsas de lípidos, desarrollo de la infección sistémica
SifA	Cromosoma	SKIP, Rab7, RhoA, SIST	Disminución de la acumulación de kinesina en SCV, modulación del tráfico vesicular, migración perinuclear de SCV, integridad de la membrana de SCV
SifB	Cromosoma	Desconocido	Desarrollo de la infección sistémica
SopD2	Cromosoma	LAMP-1, catepsina D, Rab 5	Contribuye a la agregación de los lisosomas/endosomas tardíos
SpvB	Plásmido pSLT	Actina	Inhibición de la polimerización de actina de las VAPs y de los SIFs, apoptosis de las células epiteliales y retraso de la piroptosis de macrófagos
SsaB	SPI-2	Hook3	Desorganización del aparato de Golgi y lisosomas, inhibición de la fusión de SCV-lisosomas
SseB	SPI-2	Desconocido	Translocón
SseC	SPI-2	Desconocido	Translocón
SseD	SPI-2	Desconocido	Translocón
SseF	SPI-2	Unión de la placoglobina, TIP60	Migración de las SCV y formación de microtúbulos de SIFs
SseG	SPI-2	Caprin-1, desmoplaquina	Migración perinuclear de las SCVs, formación de microtúbulos de SIFs

SseI	Gifsy-2	Filamina, TRIP6	Estimulación de la motilidad de macrófagos, aceleración de la propagación sistémica
SseJ	Cromosoma	RhoA	Formación de SIFs
SseL	Cromosoma	$\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , OSBP-1, talina	Retraso de la piroptosis de macrófagos
SspH2	Cromosoma	Filamina, profilina	Remodelación de las vacuolas asociadas a la polimerización de actina
SteB	Cromosoma	Desconocido	Desarrollo de la infección sistémica
SteC	Cromosoma	Desconocido	Cinasa involucrada en rearrreglos de F-actina para el mantenimiento de las SCV
SteD	_____	Desconocido	Contribuye a la replicación intracelular
<b>Secretadas por el SST3-1 y SST3-2</b>			
GtgE	Gifsy-2	Desconocido	Proteasa. Previene el reclutamiento de Rab29
PipA	SPI-5	Desconocido	Desarrollo de la infección sistémica
PipB2	Cromosoma	Kinesina	Acumulación de kinesina en las SCVs, inhibición de la migración perinuclear de las SCVs
SirP	Cromosoma	Trx, ERdj3	E3 Ubiquitin ligasa. Apoptosis de células epiteliales

SopD	Cromosoma	Desconocido	Invasión de células epiteliales en cooperación con SigD, inflamación, secreción de fluidos y replicación dentro de macrófagos
SpvC	Plásmido pSLT	ERK	Inhibición de la inflamación
SpvD	Plásmido pSLT	Desconocido	Contribuye a la replicación intracelular
SspH1	Gifsy-3	PKN1	E3 ubiquitin ligasa
SteA	Cromosoma	Desconocido	Cinasa relacionada con la actina
SteE	Gifsy-3	Desconocido	Cinasa relacionada con la actina

Organizadas de acuerdo al SST3 por el que se secretan. Fuente: Ramos-Morales, 2012; Fàbrega and Vila, 2013; Figueira *et al.*, 2013; Nikolaus *et al.*, 2001; Poh *et al.*, 2008; Brumell *et al.*, 2003.

#### 1.4. Regulación de los genes de SPI-1 y SPI-2

*Salmonella* ha adaptado mecanismos complejos que controlan la expresión de sus genes de virulencia en el tiempo y nicho apropiado. *In vivo* la expresión de los genes de SPI-1 se induce cuando *Salmonella* se encuentra en el intestino y se reprime cuando la bacteria se localiza dentro de macrófagos (Haraga *et al.*, 2008; Fàbrega and Vila, 2013; Moest and Méresse, 2013). En condiciones de laboratorio, la expresión de los genes de SPI-1 se induce en la fase estacionaria temprana del crecimiento de *Salmonella* en medio de cultivo rico en nutrientes Luria-Bertani (LB), en respuesta, entre otros probables factores, a la alta osmolaridad que contiene este medio (Bustamante *et al.*, 2008). La expresión de los genes de SPI-1 está controlada por múltiples reguladores codificados dentro y fuera de esta isla (Fàbrega and Vila, 2013). SPI-1 codifica para HilD, HilC e InvF, los cuales pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales AraC, así como para HilA que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales OmpR/ToxR (Figura 1). La expresión de los genes de SPI-1 se activa en cascada cuando HilD induce la expresión de HilA. HilA entonces activa directamente la expresión de algunos genes de SPI-1, como los operones que conforman el aparato de secreción del SST3-1 *prg/org* e *inv/spa*, y el que codifica para InvF, que a su vez activa la expresión del resto de genes de SPI-1, como son los operones que codifican las proteínas efectoras *sic/sip* y del translocón (SipBCD) (Figura 5). Se ha reportado que hay otros genes que codifican para proteínas efectoras secretadas por el SST3-1, como *sopE*, *sopE2*, *sigD*, *sopA*, *sopD* e *lacP*, los cuales

se localizan fuera de SPI-1 y son regulados directamente por HilA o InvF (Lostron and Lee, 2001; Mills *et al.*, 1995; Fàbrega and Vila, 2013; Thijs *et al.*, 2007).

La expresión de los genes de SPI-2 se induce *in vivo* cuando *Salmonella* se encuentra dentro de macrófagos o células epiteliales, así como en la lámina propia del epitelio intestinal (Laughlin *et al.*, 2014; Haraga *et al.*, 2008; Fàbrega and Vila, 2013; Moest and Méresse, 2013). En condiciones de laboratorio, la expresión de los genes de SPI-2 se induce en la fase estacionaria tardía del crecimiento de *Salmonella* en medios de cultivo ricos en nutrientes, como el medio LB, así también en medios mínimos, como el medio MM-N (Bustamante *et al.*, 2008). En los medios mínimos, su expresión responde, entre otros probables factores a la baja concentración de fosfato, calcio y magnesio (Deiwick *et al.*, 1999; Miao and Miller, 2000). La expresión de los genes de SPI-2 está controlada por el sistema de dos componentes SsrA/B, codificado en SPI-2. SsrA es la proteína cinasa sensora de membrana y SsrB es el regulador de respuesta (Ochman *et al.*, 1996; Cirillo *et al.*, 1998). SsrA/B regula directamente a los operones *ssa*, *ssr*, *ssc* y *sse* (Figura 6).

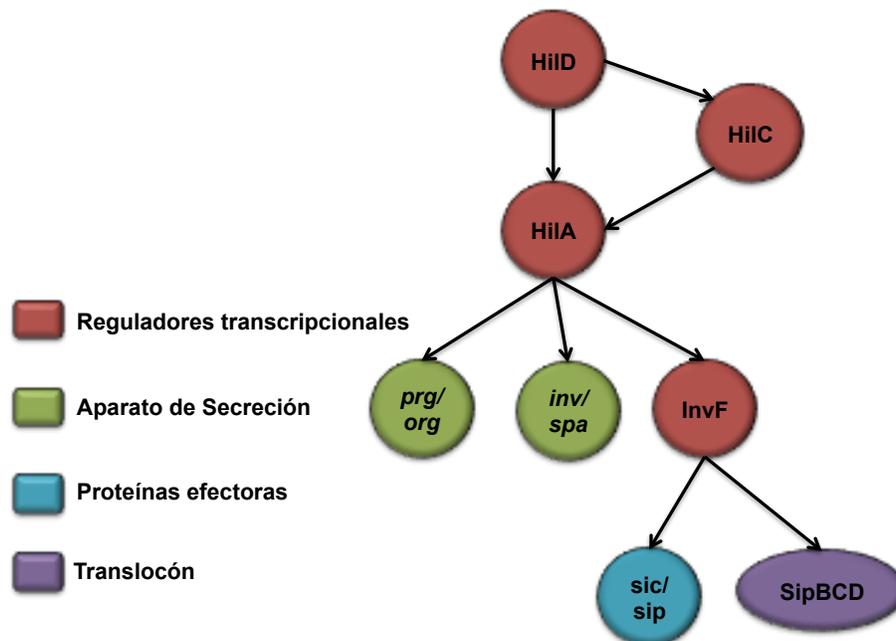


Figura 5. Regulación de SPI-1 partiendo de la activación de HilD. Se muestra la red de reguladores transcripcionales de esta isla y la activación de la expresión del aparato de secreción, proteínas efectoras y translocón de la misma.

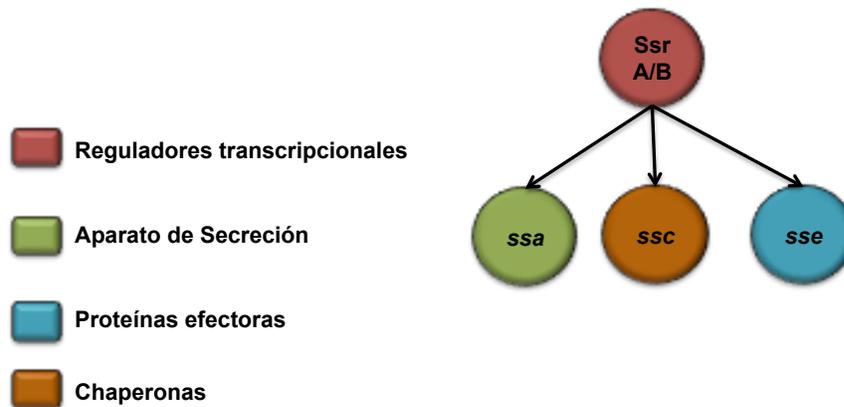


Figura 6. Regulación de SPI-2 partiendo de la activación de SsrA/B. Se muestra la activación de la expresión del aparato de secreción, proteínas efectoras y chaperonas de la misma.

### 1.5. El regulador HilD

HilD es un regulador transcripcional de la familia AraC y codificado en SPI-1 (Figura 1). Consta de 309 aminoácidos, un peso molecular de 34.3 kDa y tiene dos dominios HTH de unión al DNA en su extremo C-terminal (Schechter and Lee, 2001).

HilD regula directamente la expresión de los genes *hilA*, *hilC*, *rtsA*, *ytfk*, *lpxR*, *STM14\_1282* y *STM14\_2342*; así como también el sistema de dos componentes *ssrA/B* (Figura 7). *hilA* y *hilC* se localizan en SPI-1, mientras que *ssrA/B* en SPI-2. *rtsA* se encuentra en una isla insertada cerca del gen  $tRNA^{PheU}$ . Por otro lado, *ytfk*, *lpxR*, *STM14\_1282* y *STM14\_2342* pertenecen al genoma "core" de *Salmonella* (Figura 7) (Ellermeier and Slauch, 2003; Rakeman *et al.*, 1999; Schechter *et al.*, 1999). Asimismo, HilD regula indirectamente a varios otros genes, principalmente a través de los reguladores HilA, HilC, RtsA y SsrA/B (Figura 7) (Fàbrega and Vila, 2013; Petrone *et al.*, 2013; Saini and Rao, 2010).

Diferentes evidencias indican que HilD induce la expresión de *hilA*, *hilC*, *rtsA* y *ssrA/B* contrarrestando la represión que ejerce el regulador global H-NS sobre los promotores de estos genes (Schechter *et al.* 2003; Olekhovich and Kadner, 2006). Recientemente, en nuestro grupo se demostró la actividad antirepresora de HilD, ya que desplaza a H-NS de *ssrA/B* para inducir la expresión de este operón y así la de los genes de SPI-2 (Martínez *et al.*, 2014).

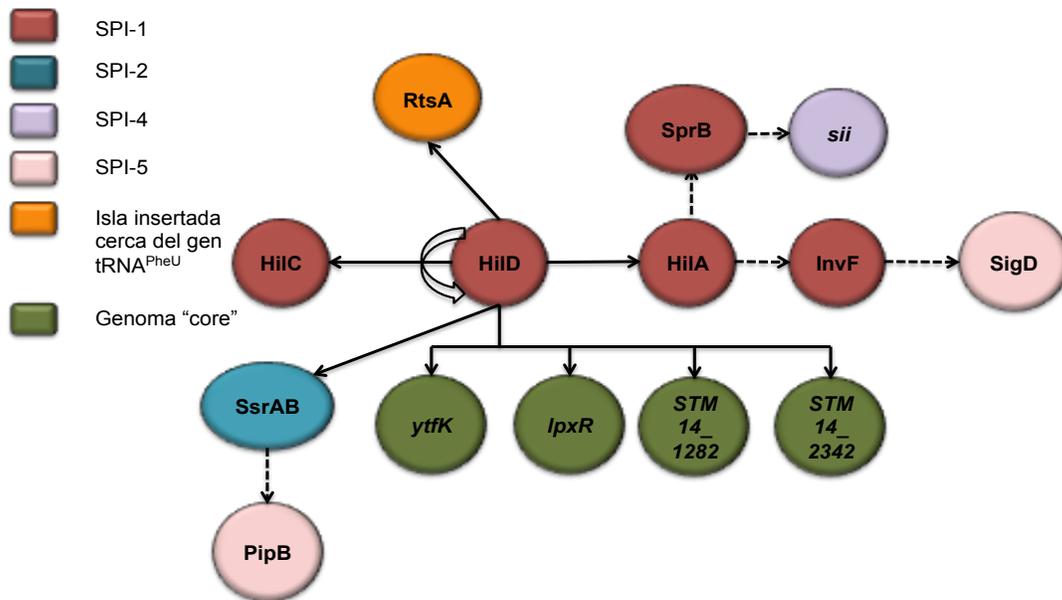


Figura 7. Regulón de HiID. HiID regula directamente (línea continua) a los genes *hilA*, *rtsA*, *hilC*, *ssrA/B*, *ytfK*, *lpxR*, *STM14\_1282* y *STM14\_2342*. Asimismo, HiID regula indirectamente (línea punteada) a varios genes a través de la regulación positiva de HilA, HilC, RtsA y SsrA/B y de esta manera controla la expresión de genes de virulencia localizados en diferentes islas de *Salmonella* (SPIs). Además, HiID se auto-regula positivamente.

## 2. ANTECEDENTES.

En el grupo del Dr. Jay Hinton (Trinity College, Dublin, Ireland) se obtuvieron recientemente los transcriptomas de la cepa WT de *S. Typhimurium* y su derivada mutante  $\Delta$ *hilD* (Hinton, datos no publicados). El análisis de estos transcriptomas reveló que HiID afecta la expresión de genes adicionales a los ya descritos. De estos genes, 18 codifican para proteínas hipotéticas. Nuestro grupo ha establecido una colaboración con el del Dr. Hinton, con el propósito de analizar la regulación y papel en virulencia de estos 18 genes no caracterizados. Resultados recientes obtenidos en nuestro grupo han confirmado, mediante otras metodologías de análisis de expresión, la regulación por HiID de estos 18 genes (Pérez-Morales, D., datos no publicados).

En este proyecto estudiamos la regulación y el papel en virulencia de 4 de estos genes (*SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263*) seleccionados al azar.

La tabla 2 muestra el análisis de la comparación de los transcriptomas, obtenidos por RNAseq, de la cepa WT de *S. Typhimurium* y su derivada mutante  $\Delta$ *hilD*, para los 4 genes que se caracterizaron en este proyecto. Los transcriptomas se obtuvieron de muestras de cultivos de estas cepas crecidas en el medio rico en nutrientes Lenox. La expresión relativa  $\Delta$ *hilD*/WT indica que los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* son regulados por HiID. Estos genes constan de 240, 306, 231 y 960 pb, respectivamente, la característica de sus productos

determinados por bioinformática, así como su número de residuos de aminoácidos se indican en la tabla 2. La proteína SL1770 tiene un peso molecular calculado de 8.439 kDa y posee un dominio de la familia YobH, en la región del aminoácido 2 a 71, la cual es una proteína cuya función no está caracterizada y se encuentra en *E. coli*; también se encontró un dominio transmembrana para esta proteína. Las proteínas SL1872 y SL2438, con pesos moleculares de 11.769 y 8.308 kDa, respectivamente, no tienen algún dominio funcional que se pueda predecir por bioinformática. La proteína SL1263 tiene un peso molecular calculado de 34.84 kDa y posee un dominio de la familia de la proteína DUF2219, en la región del aminoácido 43 a 319, la cual es una proteína de la que se desconoce su función, pero está conservada en bacterias; también se encontró un péptido señal en la región del aminoácido 1 a 23 del extremo amino terminal.

**Tabla 2. Características de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263***

ORF	Expresión relativa ( $\Delta hiiD$ /WT)	Característica determinada por bioinformática	Número de residuos de aminoácidos.
<b><i>SL1770</i></b>	0.0837	Proteína hipotética que se exporta	79
<b><i>SL1872</i></b>	0.255	Proteína hipotética conservada	101
<b><i>SL2438</i></b>	0.286	Proteína hipotética	76
<b><i>SL1263</i></b>	0.0597	Proteína hipotética de membrana externa	319

Entre las características comunes de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* es que tienen un promotor dependiente del factor sigma 70. También, como se muestra en la figura 8, estos cuatro genes son monocistrónicos. El contenido de G+C difiere entre ellos, el del gen *SL1770* es cercano al del genoma “core” de *Salmonella* Typhimurium, en cambio el de los genes *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* es menor, lo cual sugiere que éstos últimos pudieron ser adquiridos por transferencia horizontal.

La posición en el genoma del gen *SL1770* es de 1894788 a 1895027, en una isla compuesta por 11 genes (Porwollik and McClelland, 2003). Corriente arriba se encuentra el gen *yobG*, cuyo producto es una proteína hipotética de membrana y corriente abajo el gen *kdgR*, un represor transcripcional putativo (Figura 8.A). El

gen *SL1872* se localiza de la región 1990157 a 1990462, en una isla que consta de 21 genes, incluyendo al gen que codifica para la proteína efectora SopE2, la cual es secretada por el SST3-1 (Porwollik and McClelland, 2003). Corriente arriba del gen *SL1872* se ubica el gen *yecA*, el cual codifica para una proteína hipotética conservada, y corriente abajo el gen *SL1873*, cuyo producto es una proteína hipotética exportada (Figura 8.B). En el genoma se localiza el gen *SL2438* en la región 2583279 a 2583509, en una isla conformada por 16 genes que comprende al que codifica para la proteína efectora SspH2 secretada por el SST3-2 (Porwollik and McClelland, 2003). Corriente arriba se localiza el gen *tktB*, que codifica para una transcetolasa 2, y corriente abajo el gen *ypfG*, cuyo producto es una proteína hipotética exportada (Figura 8.C). La ubicación en el genoma del gen *SL1263* es de 1363971 a 1364930 en una isla constituida por 30 genes, entre los que se localiza *msgA*, gen que codifica una proteína hipotética de virulencia (Porwollik and McClelland, 2003). Corriente arriba se encuentra el gen *ydiY*, que codifica para una proteína hipotética de membrana externa, y corriente abajo el operón que involucra a los genes *SL1264* y *SL1265*, cuyo producto es una proteína hipotética de membrana y una endonucleasa DNA/RNA no específica, respectivamente (Figura 8.D). Por lo tanto, la mayoría de los genes que rodean a los estudiados en este proyecto, codifican para proteínas hipotéticas.

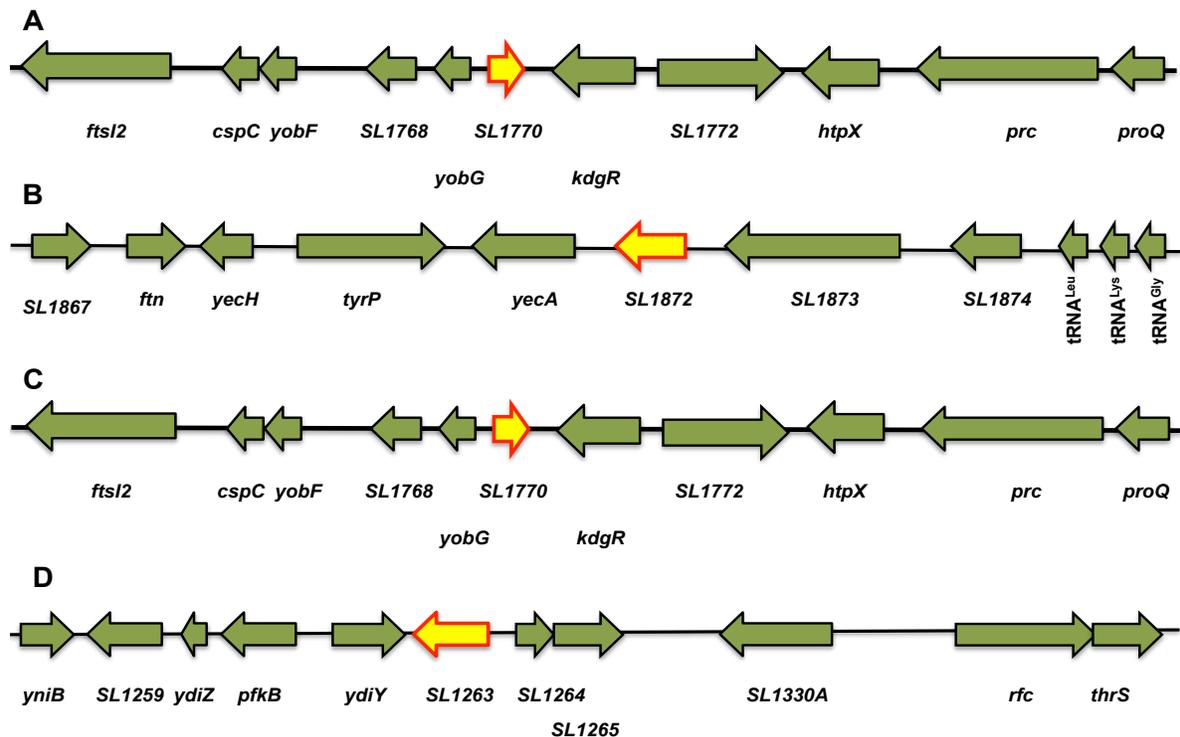


Figura 8. Contexto genómico de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263*. El gen *SL1770* está rodeado por los genes *yobG* y *kdgR*(A). El gen *SL1872* se localiza entre los genes *yecA* y *SL1873* (B). El gen *SL2438* tiene como genes circundantes a *tktB* y *ypfG* (C). El gen *SL1263* se encuentra entre el gen *ydiY* y el operón que comprende los genes *SL1264* y *SL1265* (D). Los genes estudiados se resaltan con color amarillo y contorneados con rojo.

---

### 3. HIPÓTESIS.

HilD regula indirectamente la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263*, los cuales son requeridos para la virulencia de *Salmonella*.

### 4. OBJETIVOS.

#### 4.1. General

Analizar la regulación mediada por HilD y papel en virulencia de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263*.

#### 4.2. Particulares

1. Determinar si HilD regula directa o indirectamente la expresión de estos genes.
2. Determinar si los productos de estos genes son requeridos por el SST3 de SPI-1 para la secreción de proteínas efectoras.
3. Investigar si estos genes son importantes en la invasión de *Salmonella* a células epiteliales.

### 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

Las cepas, plásmidos y oligonucleótidos se enlistan en las tablas 4, 5 y 6.

**Tabla 3. Antibióticos y dosis empleadas.**

Antibiótico	Dosis
Estreptomina (Str)	100 µg/mL
Ampicilina (Amp)	200 µg/mL
Kanamicina (Km)	20 µg/mL
Ácido nalidíxico	15 µg/mL
Gentamicina	50 mg/mL

**Tabla 4. Cepas bacterianas.**

Cepa	Descripción	Origen o referencia
<b><i>S. Typhimurium:</i></b>		
<b>WT</b>	Cepa silvestre SL1344 Str <sup>R</sup>	Hoiseh and Stocker, 1981
<b><math>\Delta hilD::Km</math></b>	Derivada de SL1344; $\Delta hilD::Km$ , Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Bustamante, <i>et al.</i> , 2008
<b><math>\Delta hilD</math></b>	Derivada de SL1344; $\Delta hilD$ , Str <sup>R</sup>	Bustamante, <i>et al.</i> , 2008
<b><math>\Delta hilA::Km</math></b>	Derivada de SL1344; $\Delta hilA::Km$ , Stp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Bustamante, <i>et al.</i> , 2008
<b><math>\Delta invF::Km</math></b>	Derivada de SL1344; $\Delta invF::Km$ , Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Bustamante, <i>et al.</i> , 2008
<b><math>\Delta ssrB::Km</math></b>	Derivada de SL1344; $\Delta ssrA/B::Km$ , Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Bustamante, <i>et al.</i> , 2008
<b><math>\Delta SL1770::Km</math></b>	Derivada de SL1344; $\Delta SL1770::Km$ , Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este trabajo
<b><math>\Delta SL2438::Km</math></b>	Derivada de SL1344; $\Delta SL2438::Km$ , Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este trabajo
<b><math>\Delta SL1872::Km</math></b>	Derivada de SL1344; $\Delta SL1872::Km$ , Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este trabajo
<b><i>SL1770::3XFLAG-Km</i></b>	Derivada de SL1344; expresa la proteína SL1770-FLAG Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este trabajo
<b><i>SL2438::3XFLAG-Km</i></b>	Derivada de SL1344; expresa la proteína SL2438-FLAG Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este trabajo
<b><i>SL1872::3XFLAG-Km</i></b>	Derivada de SL1344; expresa la proteína SL1872-FLAG Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Este trabajo
<b><i>E. coli:</i></b>		
<b>DH10<math>\beta</math></b>	Cepa de laboratorio, Str <sup>R</sup>	Invitrogen
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	Cepa de laboratorio, Nal <sup>R</sup>	Invitrogen
<b>MC4100</b>	Derivada de K12, cepa silvestre de laboratorio; Str <sup>R</sup>	Casadaban, 1976

**Tabla 5. Plásmidos utilizados.**

Plásmido	Descripción	Origen o referencia
<b>pKK232-8</b>	Derivado de pBR322, contiene el gen <i>cat</i> (cloranfenicol acetil transferasa) sin promotor, empleado para la construcción de fusiones transcripcionales; Amp <sup>R</sup>	Pharmacia LKB Biotechnology (Brosius, 1984).
<b>pssaG-cat</b>	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssaG-cat</i> , Amp <sup>R</sup>	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
<b>pinvF-cat</b>	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>invF-cat</i> , Amp <sup>R</sup>	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
<b>pSL1770-cat</b>	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>SL1770-cat</i> , Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pSL1263-cat</b>	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>SL1263-cat</i> , Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pSL2438-cat</b>	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>SL2438-cat</i> , Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pSL1872-cat</b>	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>SL1872-cat</i> , Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>pKD4</b>	Derivado de pANTSy, contiene el gen de resistencia a kanamicina, flanqueado por FRT's	Datsenko and Wanner, 2000
<b>pKD46</b>	Derivado de pINT-ts, contiene el sistema de recombinación del fago λ RED bajo el control de un promotor inducible por arabinosa; Amp <sup>R</sup>	Datsenko and Wanner, 2000
<b>pSUB11</b>	Derivado de pGP704, contiene el gen de resistencia a kanamicina y la secuencia del epítipo 3Xflag	Uzzau <i>et al.</i> , 2001
<b>pMPM-K6</b>	Vector de clonación de bajo número de copias; contiene el promotor lac Km <sup>R</sup>	Mayer, 1995
<b>pK6-hiID</b>	Derivado del vector de clonación pMPM-K6; contiene el gen que expresa a la proteína HiID bajo un promotor inducible con arabinosa.	Paredes C., datos no publicados.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Modificación
<b>Construcción de la fusión <i>SL1770-cat</i></b>		
SL1770-FW22	CCTGGATCCACAGCAACAGGCATACTAC	BamHI
SL1770-RV11	GTTAAGCTTACTTCCCACCAGGATGCC	HindIII
<b>Construcción de la fusión <i>SL1263-cat</i></b>		
SL1263-FW66	AACGGATCCTTATATGCATAATCGTGAAGCC	BamHI
SL1263-RV55	TTGAAGCTTGTGGTCGACTGAGTATGG	HindIII
<b>Construcción de la fusión <i>SL2438-cat</i></b>		
2438FW-1	ATAAAGCTTCAGGCAGCCACAATGGGG	HindIII
2438RV-2	CGAGGATCCGAGCTGCGATAGCTGGC	BamHI
<b>Construcción de la fusión <i>SL1872-cat</i></b>		
1872FW-1	CAGGTCGACAAGATCGCGCTCTGACCG	Sal I
1872FW-2	TGAGGATCCTGAGCTGATATCACTGGC	BamHI
<b>Construcción de la mutante <math>\Delta</math>SL1770::<i>Km</i></b>		
SL1770H1P1	TCTAACTAAAAAAGAAAAGAGGTAGTAATGCGTTTGATCAT TTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Oligo sin cambios en la secuencia
SL1770H2P2	ATTATTTATTGCCGCTTAGCCATTATCCACCACGGTGGCGA TCATATGAATATCCTCCTTAG	Oligo sin cambios en la secuencia
<b>Caracterización de la mutante <math>\Delta</math>SL1770::<i>Km</i></b>		
SL1770-RV02	GCTACGAAAATGTAGCTGC	Oligo sin cambios en la secuencia
<b>Construcción de la mutante <math>\Delta</math>SL2438::<i>Km</i></b>		
SL2438H1P1	GATAGCCTCACACAGCAGGAAATAGTATGAAAATAAATAA TTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Oligo sin cambios en la secuencia
SL2438H2P2	GTAGGCTGTGCAAATTACTTCGTAGACTCAGGCGCATCT GACATATGAATATCCTCCTTAG	Oligo sin cambios en la secuencia
<b>Caracterización de la mutante <math>\Delta</math>SL2438::<i>Km</i></b>		
2438FW-2	ATACGGTGAATCCGCTCCG	Oligo sin cambios en la secuencia

<b>Construcción de la mutante <math>\Delta SL1872::Km</math></b>		
<b>SL1872H1P1</b>	TGTTGGCGGTATCTGGCTGGAGGCTGGGTGGTAAAAAGA CGTTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Oligo sin cambios en la secuencia
<b>SL1872H2P2</b>	TATACTCATGCTAACTTATACCACCGCCGCGGACAGATAA AACATATGAATATCCTCCTTAG	Oligo sin cambios en la secuencia
<b>Caracterización de la mutante <math>\Delta SL1872::Km</math></b>		
<b>SL1872 FW-2</b>	CCGCAGTAATCAGACCGTC	Oligo sin cambios en la secuencia
<b>Etiquetado del gen <i>SL1770</i> con el epítipo FLAG</b>		
<b>SL1770FLAG-F</b>	TGTCCCATTTTCAGAAAAATCGCCACCGTGGTGGATAATG GCGACTACAAAGACCATGACGG	Oligo sin cambios en la secuencia
<b>SL1770FLAG-R</b>	AATTATTGGTGATAGTTTCACTGTGAAATTATTTATTGCCG CCATATGAATATCCTCCTTAG	Oligo sin cambios en la secuencia
<b>Etiquetado del gen <i>SL2438</i> con el epítipo FLAG</b>		
<b>SL2438FLAG-F</b>	GAGGTCGTCATCGGGCAGTCAGATGCGCCTGAGTCTACG AAG GACTACAAAGACCATGACGG	Oligo sin cambios en la secuencia
<b>SL2438FLAG-R</b>	ACTTTGCACAGTCTGCAGACCTGTTCTGTAGGCTGTGCAA AACATATGAATATCCTCCTTAG	Oligo sin cambios en la secuencia
<b>Etiquetado del gen <i>SL1872</i> con el epítipo FLAG</b>		
<b>SL1872FLAG-F</b>	CTCTATTTGAGAGGGCGGTTTTATCTGTCCGCGGCGGTGG TA GACTACAAAGACCATGACGG	Oligo sin cambios en la secuencia
<b>SL1872FLAG-R</b>	AAGCGAGAGATGGGTTTCTCGCTATATTATACTCATGCTAA CCATATGAATATCCTCCTTAG	Oligo sin cambios en la secuencia
<b>Ensayos de retardamiento</b>		<b>Gen blanco</b>
<b>hilA1F-Bam</b>	ATCGGATCCCTCTGAGAACTATTTGC	<i>hilA</i>
<b>hilA2R-Hin</b>	GACAAGCTTTTCTGAGCGTAGCAGGG	<i>hilA</i>
<b>SigD-BHI-F</b>	TCCCGACAGGATCCTTTTACCCATG	<i>sigD</i>
<b>SigD-H3-R</b>	CGTTGTATAAGCTTTTTTGTAG	<i>sigD</i>

Los cambios de bases en la secuencia del oligonucleótido con respecto a la secuencia WT, diseñados para el reconocimiento de las enzimas de restricción, se encuentran subrayados.

---

## 5.1. Construcción de las fusiones transcripcionales

Se procedió como describe Bustamante *et al.*, 2008. Para la construcción de los plásmidos que contienen las fusiones transcripcionales *SL1770-cat*, *SL1263-cat*, *SL2438-cat* y *SL1872-cat*, primero se amplificaron por PCR las regiones reguladoras de estos genes, empleando los respectivos oligonucleótidos descritos en la Tabla 6. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% con solución amortiguadora TAE (Tris-Acetato-EDTA 0.5X, pH 8.0) a 80 V. Se tiñó el gel con bromuro de etidio (0.5 µL/mg) y se observó el DNA teñido en un transiluminador de luz UV de onda corta (Sigma). Se cortó la banda correspondiente al tamaño de la región amplificada y se purificó con el kit “Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit” (ZYMO RESEARCH). Una vez purificado el DNA, se digirió, al igual que el plásmido pKK232-8 (contiene al gen *cat* sin promotor), con las enzimas de restricción correspondientes, HindIII-BamHI o Sall-BamHI. Las dobles digestiones se purificaron con el kit “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche) y se observaron en un gel de agarosa al 1%. Con base en lo observado se colocó para la ligación, la cantidad necesaria del plásmido pKK232-8 y del fragmento de DNA amplificado, de forma tal que se obtuviera una relación de 5:1 molar. Para esta reacción, se mezcló el fragmento de DNA que nos interesaba clonar y el fragmento de DNA del vector linearizado y se incubó a 16°C durante toda la noche con la enzima ligasa T4. Al día siguiente se precipitaron las reacciones de ligación agregando 1 µL de glicógeno (20 mg/mL) (Roche) y 500 µL de etanol absoluto e incubando 30 minutos a -20°C. Se centrifugaron estas reacciones durante 15 min a 14,000 rpm, se removió el sobrenadante y se lavó una vez con 1 mL de etanol al 70%. Se agitó y centrifugó en las mismas condiciones anteriores, se desechó el sobrenadante, se secaron durante 10-15 min en Speedvac sc100 (Savant) y se resuspendieron en 10 µL de agua milli Q. 5 µL de las reacciones de ligación se usaron para transformar por electroporación las cepas *E.coli* DH10 β y *E. coli* DH5α.

Se confirmó que el plasmido pKK232-8 tuviera los fragmentos *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263*, mediante su purificación de varias colonias de las transformantes por miniprep. Los plásmidos purificados se corrieron en un gel de agarosa al 1% y se seleccionó uno de los que se vió que contenía el inserto, éste se purificó por columna con el kit “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche) y se obtuvo la secuencia nucleotídica en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

---

## 5.2. Purificación de plásmidos

Se prepararon inóculos con las cepas que contienen los plásmidos de interés, en 5 mL de medio LB con los antibióticos para los que presentan resistencia (Tabla 3), se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm.

Al día siguiente se obtuvo una pastilla de bacterias concentrando todo el cultivo, centrifugando sucesivamente durante 2 min a 13,000 rpm. La pastilla se resuspendió en 150 µL de buffer SET, se agregaron 8 µL de RNAsa (10 mg/mL) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Enseguida se agregaron 400 µL de solución salina (NaOH 0.2 M/SDS 1%) y se mezcló, se incubó durante 5 min en hielo. Transcurridos los 5 min se agregaron 300 µL de acetato de amonio 7.5 M pH 7.8 y se mezcló, se incubó durante 10 min en hielo. Después se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se agregaron 500 µL de isopropanol, se agitó y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Enseguida se centrifugaron las muestras durante 10 min a 14,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó en las condiciones anteriores y se desechó el sobrenadante. Las muestras se secaron bien y se resuspendieron en 50 -100 µL de agua milli Q.

## 5.3. Preparación de células electrocompetentes

Se prepararon inóculos de las cepas de interés en 5 mL de medio LB con los antibióticos para los que presentan resistencia y se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm. El día posterior se transfirió 1 mL del inóculo a un matraz de 250 mL con 100 mL de medio LB adicionado con los antibióticos adecuados. Los matraces se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 0.6-0.8. El cultivo se transfirió a tubos Nalgene de 50 mL, se centrifugaron durante 8 min a 8,000 rpm a 4°C y se desechó el sobrenadante. Enseguida se lavó la pastilla con 40 mL de agua milli Q estéril previamente enfriada, se centrifugó en las condiciones anteriores y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, se agregaron 40 mL de glicerol al 10% estéril previamente enfriado, se centrifugó en las condiciones anteriores y se desechó el sobrenadante. Finalmente se resuspendió la pastilla en 200-400 µL de glicerol al 10% estéril.

## 5.4. Electroporación

Se colocaron en hielo las celdas de electroporación (BIORAD). Enseguida se agregaron en un tubo Eppendorf 5 µL del plásmido con el que se transformó y 40 µL de células electrocompetentes, se mezclaron y se colocaron en la celda de electroporación. A continuación se le dió un pulso eléctrico de 2.5 kV durante 5.5 ms empleando un electroporador “*E. coli* pulser” (BIORAD). Posteriormente, se agregó 1 mL de medio SOC a la celda, se mezcló y se transfirió a un tubo de

---

ensaye, se incubaron los tubos con cultivo durante una hora a 37°C en agitación de 200 rpm. Enseguida se tomaron 250 µL del cultivo y se sembraron en cajas Petri con medio LB solidificado con agar al 1.5% con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C durante aproximadamente 16 horas.

### **5.5. Cultivos bacterianos para cuantificar la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2**

Se llevó a cabo como lo detalla Martínez *et al.*, 2011.

- Preparación de muestras de cultivos bacterianos en LB

Se crecieron inóculos de las cepas transformadas, en 5 mL de medio LB con los antibióticos para los que presentan resistencia, se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm. Se transfirieron 500 µL de los inóculos a matraces de 250 mL con 50 mL de medio LB adicionados con los antibióticos adecuados (se realizó por duplicado). Se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm y se tomaron muestras de 1 mL a la hora 4 y 9 de incubación. Se centrifugaron las muestras durante 2 min a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Enseguida se lavaron las pastillas con 650 µL de solución de lavado TDTT (Tris-HCl, pH 7.8 50 mM, y DL-ditiotreitol 30 µM), se centrifugaron en las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante.

En caso de no llevar a cabo el ensayo inmediatamente, se guardaron las pastillas a -20°C, de lo contrario se resuspendieron en 800 µL de TDTT.

- Preparación de muestras de cultivos bacterianos en MM-N

Se realizaron los inóculos de la misma forma que para el medio LB donde las cepas transformadas se colocaron en 5 mL de medio LB con los antibióticos para los que presentan resistencia. Después se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm. Al día siguiente se transfirió 1 mL de los tubos de ensaye a tubos Eppendorf estériles, se centrifugaron durante 2 min a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se lavaron las pastillas con 1 mL de medio MM-N, se centrifugaron en las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante. Enseguida se resuspendieron las pastillas en 500 µL de medio MM-N, los cuales se transfirieron a matraces de 250 mL con 50 mL de medio MM-N adicionados con los antibióticos adecuados (se realizó por duplicado). Se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante 15 horas y en este punto se tomaron dos muestras de 1.5 mL, las cuáles se centrifugaron durante 2 min a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Después se lavaron las pastillas en 650 µL de solución de lavado TDTT, se centrifugaron en las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante.

---

En caso de no llevar a cabo el ensayo inmediatamente, se guardaron las pastillas a -20°C, de lo contrario se resuspendieron en 800 µL de TDTT.

### **5.6. Cuantificación de la actividad enzimática específica de CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa)**

La cuantificación de la actividad específica de la enzima CAT se realizó utilizando una modificación de un método espectrofotométrico descrito previamente por Puente *et al.*, 1996. Las pastillas resuspendidas en TDTT se sonicaron durante 3 min en un sonicador “Vibra Cell”, con pulsos de 9.9 s y períodos de reposo de 9.9 s entre cada pulso, el tiempo total de sonicación fué de 6 min. Una vez sonicadas las muestras, se centrifugaron durante 15 min a 13,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a tubos limpios.

La cuantificación de proteínas totales en el sobrenadante se realizó en placas de cultivo celular de 96 pozos (Costar) donde se agregó a cada pozo por duplicado 10 µL de muestra y 10 µL de solución de lavado TDTT como blanco, cada una en su lugar correspondiente. A continuación se agregaron 200 µL de la mezcla de los reactivos BCA en una proporción 50:1, BCA “Protein Assay Reagent” (Pierce). Se incubaron las placas a 37°C durante 30 min. La lectura de absorbancia se realizó a 562 nm en un lector automatizado de microplacas tipo CERES 900 C (Bio-Tek Instruments Inc.), con el programa KC4. Los valores obtenidos se interpolaron en una curva estándar de BCA (albúmina de suero bovino) (mg/mL) ya cargada en el sistema.

La cuantificación de CAT se llevó a cabo colocando en otras placas de cultivo celular de 96 pozos (Costar) 5 µL de muestra en cada pozo por duplicado, y 200 µL de la mezcla de reactivos Tris-HCl pH 7.8 0.1 M, DNTB (ácido 5, 5' ditio-bis (2-nitrobenzoico) (*Research Organics*) 1 mM, acetil-CoA 0.1 mM (Pharmacia Biotech) y cloranfenicol 0.1 mM (Sigma). Se midió la absorbancia a 404 nm cada 5 s durante 5 min de reacción, en el mismo lector automatizado de microplacas y con el programa KC4, los resultados se interpolan en una curva estándar de CAT (0-2,500 U/mL) almacenada en el programa.

El cálculo de la actividad específica de CAT (µmol/min/mg) se realizó al dividir la actividad de CAT entre la concentración de proteínas totales.

### **5.7. Construcción de cepas mutantes**

La mutagénesis por PCR se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Datsenko y Wanner (Datsenko and Wanner, 2000). La estrategia consiste en sustituir los genes que se desean mutar (*SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1872*) con un gen seleccionable de resistencia a kanamicina que es generado por PCR, utilizando oligonucleótidos que tienen 42 nucleótidos homólogos al gen que se desea remover (H1 y H2). En este procedimiento, la recombinación requiere la

---

recombinasa del fago  $\lambda$  RED, la cual es sintetizada bajo el control de un promotor inducible por arabinosa en un plásmido de bajo número de copias (pKD46).

Se amplificó el gen de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4 empleando los oligonucleótidos que proveen la región homóloga al gen de interés (oligos H1P1/H2P2) (Tabla 6). Se realizaron 5 reacciones de PCR y se juntaron en un solo tubo Eppendorf. Se agregaron 100  $\mu$ L de acetato de amonio pH 7.8, 300  $\mu$ L de fenol y 300  $\mu$ L de cloroformo alcohol isoamílico. Después se mezcló y se centrifugó durante 5 min a 14,000 rpm. Transcurridos los 5 min se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregaron 500  $\mu$ L de cloroformo alcohol isoamílico. Enseguida se mezcló y se centrifugó en las condiciones anteriores y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregó 1 mL de alcohol absoluto se agitó y se dejó precipitando durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$  o bien a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Al día siguiente (o transcurrida una hora), se centrifugaron los tubos durante 30 min a 14,000 rpm. Enseguida se desechó el etanol absoluto, se agregó 1 mL de etanol al 70%, se mezcló y se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm. Después se desechó el sobrenadante, se secaron durante 15 min con calor medio en Speedvac sc100 (Savant). Las pastillas se resuspendieron en 16  $\mu$ L de agua y se observó en un gel de agarosa al 1%.

Se realizó un pre-inóculo de la cepa *S. Typhimurium* SL1344/ pKD46 en cajas de LB con ampicilina y se incubaron durante toda la noche a  $30^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente se inocularon de 20-40 colonias en 25 mL de medio SOB más 25  $\mu$ L de ampicilina y 2.5 mL de L-+-arabinosa 1 M, ya que el plásmido pKD46 tiene promotor inducible por arabinosa. Después se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  en agitación a 200 rpm hasta obtener una  $\text{DO}_{600}$  de 0.6, se centrifugó durante 10 min a 8,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ , se lavó 3 veces la pastilla en 1 mL de agua fría centrifugando durante 5 min a 8,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ , se resuspendió la pastilla en 100  $\mu$ L de agua fría.

De los 100  $\mu$ L de células electrocompetentes se tomaron 50  $\mu$ L y se electroporaron con 3-6  $\mu$ L del producto de PCR concentrado. Enseguida se agregó 1 mL de medio SOC y se incubaron los tubos de ensaye durante 3 horas a  $30^{\circ}\text{C}$  (temperatura a la cual se replica el plásmido pKD46) en agitación a 200 rpm. Transcurridas las 3 horas de incubación se plaquearon 200  $\mu$ L en LB agar con kanamicina y se incubaron las cajas a  $37^{\circ}\text{C}$  (temperatura a la cual se pierde el plásmido pKD46) durante toda la noche. El resto del cultivo se dejó a temperatura ambiente. En caso de no haber obtenido colonias, el resto del cultivo se plaqueó en LB agar más kanamicina y se incubó a  $42^{\circ}\text{C}$  toda la noche (para asegurar que se perdiera el plásmido pKD46).

De las colonias que presentaron resistencia a kanamicina, pero sensibilidad a ampicilina, ya que el plásmido pKD46 tiene un casete de resistencia a éste antibiótico, se purificó DNA total. Enseguida se realizó la caracterización amplificando por PCR con los oligonucleótidos diseñados para este fin (Tabla 6)

---

los fragmentos correspondientes al gen de interés y al casete de kanamicina en la cepa de *S. Typhimurium* WT y sus respectivas mutantes. Después se seleccionó la colonia donde su producto de PCR en un gel de agarosa 1% mostrara el tamaño correspondiente al casete de kanamicina de aproximadamente 1500 pb.

Para etiquetar los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* con el epítotope FLAG, se desarrolló la técnica descrita para la construcción de cepas mutantes con la modificación realizada por Uzzau *et al.*, 2001, donde se utilizó como templado el plásmido pSUB11 y se emplearon oligonucleótidos homólogos para flanquear el codón de paro de la traducción (FLAG-F y FLAG-R).

### **5.8. Perfil de proteínas secretadas**

Se ejecutó como lo describe Martínez *et al.*, 2011. Se prepararon inóculos de las cepas por analizar en 5 mL de medio LB adicionado con los antibióticos correspondientes de resistencia de las cepas, se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación de 200 rpm. Al día siguiente se transfirieron 50 µL de los cultivos de toda la noche a 5 mL de medio LB sin antibióticos, se incubaron durante 9 horas a 37°C en agitación de 200 rpm. Transcurridas las 9 horas se pasaron 3 alícuotas de 1.5 mL de cada tubo a tubos Eppendorf, los cuales se centrifugaron durante 5 min a 14,000 rpm. Posteriormente se tomaron 1.3 mL del sobrenadante y se transfirieron a tubos nuevos. Enseguida se agregaron 200 µL de ácido tricloroacético al 100% (Mallinckrodt) y se dejaron precipitando las proteínas toda la noche a 4°C. El día posterior se centrifugaron las proteínas 30 min a 14,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Después se secaron las muestras durante 10-15 min en Speedvac sc100 (Savant) y se resuspendieron las pastillas en 25 µL de buffer de carga SDS-PAGE 1X. Entonces, se calentaron las muestras a 95°C durante 5 min. Transcurrido este tiempo, a cada tubo se le añadieron 2 µL de Tris-HCl 2 M pH 11 y se calentaron nuevamente a 95°C durante 5 min. Finalmente las 3 muestras de cada cepa se concentraron en un solo tubo y se visualizaron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. El gel se tiñó con colorante azul brillante de Coomassie (Brillant blue R-250).

### **5.9. Inmunodetección de proteínas mediante “Western blot”**

Se desarrolló como lo detalla Martínez *et al.*, 2011. Muestras de 1.0 y 1.5 mL de cultivo de medio LB y MM-N respectivamente, crecidas de acuerdo a lo descrito previamente en el apartado de “Cultivos bacterianos para cuantificar la expresión de los genes SPI-1 y SPI-2”, se centrifugaron durante 2 min a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas de bacterias obtenidas fueron resuspendidas en 200 µL de amortiguador de carga SDS-PAGE 1X. Estas muestras se calentaron a 95°C durante 5 min y se visualizó el extracto de proteínas totales en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%, usando

---

amortiguador de corrida Tris-Glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0.1%).

Otro gel de los mismos extractos de proteínas se utilizó para la transferencia de éstas a una membrana de nitrocelulosa de poro 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore), en una cámara de transferencia semi-seca (Bio-Rad), usando amortiguador de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20%, SDS 0.04%) durante 45 min a 15 V. Las membranas que contenían las proteínas transferidas fueron bloqueadas con leche desgrasada al 5% en PBST (PBS 1X, Tween 20 0.03%) durante una hora.

Posteriormente la membrana se incubó en agitación durante toda la noche con los anticuerpos monoclonales anti-FLAG M2 (SIGMA) o anti-GroEL (StressGen), diluidos en PBST 1: 2,000 y 1: 50,000 respectivamente. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó 3 veces con PBST en agitación durante 15 min. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo (1: 10,000) (PIERCE) para detectar a los anticuerpos anti-GroEL y anti-FLAG. Las membranas se mantuvieron en agitación durante dos horas. Se realizaron de nuevo 3 lavados durante 15 min con PBST en agitación.

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

### **5.10. Transducción utilizando el fago P22**

Obtención de fagos P22 con los genes etiquetados con FLAG. Se pusieron inóculos de las cepas de *S. Typhimurium* con los genes etiquetados con el epítotope FLAG en 5 mL de medio LB con los antibióticos adecuados, se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se agregó 1 mL de caldo P22 a 200  $\mu\text{L}$  de los cultivos de toda la noche, la multiplicidad final de la infección fue de 0.01-0.1 fagos/célula. Después se incubaron los tubos a 37°C en agitación. Transcurrido este tiempo se transfirió el cultivo a tubos para microcentrifuga, se centrifugaron durante 2 min a 12,000 rpm y se colocó el sobrenadante en un tubo limpio, seguido de esto se agregó  $\text{CHCl}_3$  y se agitó con vórtex. Se guardaron a 4°C.

Transducción de los alelos *SL1770-FLAG:Km*, *SL1872-FLAG:Km* y *SL2438-FLAG:Km* de la cepa de *S. Typhimurium* WT a la cepa  $\Delta\text{hilD}$ . Para la transducción se creció durante toda la noche la cepa de *S. Typhimurium*  $\Delta\text{hilD}$  sin el casete de resistencia a kanamicina en 5 mL de medio LB a 37°C. Al siguiente día se realizaron las mezclas de la tabla 7 en tubos estériles para microcentrifuga.

**Tabla 7. Mezclas para llevar a cabo la transducción de las proteínas etiquetadas con FLAG de la cepa de *S. Typhimurium* WT a la  $\Delta hilD$ .**

Tubo	mL de células	mL de P22	
A	200 $\mu$ L	-----	Control sin fago
B	-----	5 $\mu$ L	Control sin células
C	200 $\mu$ L	1 $\mu$ L	
D	200 $\mu$ L	5 $\mu$ L	
E	200 $\mu$ L	20 $\mu$ L	

Una vez realizadas las mezclas, se dejaron los tubos a temperatura ambiente durante 15 min para permitir la adsorción del fago. Transcurrido el tiempo de adsorción, se agregó 1 mL de medio LB y se incubaron los tubos a 37°C. Después de la hora de incubación, se centrifugaron durante 1 minuto y se desechó el sobrenadante. Enseguida se agregó 1 mL de LB, se agitaron los tubos con vórtex para resuspender la pastilla, se centrifugaron nuevamente durante 1 minuto, posteriormente se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 300  $\mu$ L de LB. Se tomaron 250  $\mu$ L de cultivo y se sembraron en cajas de LB con kanamicina, éstas se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se seleccionaron 6 colonias y se aislaron por estría cruzada, se realizaron 3 pases. Después del tercer pase se seleccionaron dos colonias y se caracterizaron realizando un perfil de proteínas secretadas al medio de cultivo con la finalidad de comprobar que se tiene la cepa de *S. Typhimurium*  $\Delta hilD$  y amplificando por PCR los genes con las etiquetas del epítipo FLAG.

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

Se procedió como lo especifica Martínez *et al.*, 2014. Se amplificaron por PCR las regiones reguladoras de los genes *hilA*, *sigD*, *SL1770*, *SL1872* y *SL2438*; empleando DNA cromosomal de *S. Typhimurium* SL1344 (Tabla 4) y los oligonucleótidos respectivos (Tabla 6). Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit comercial "Zymoclean™ DNA clean & concentrator" (ZYMO RESEARCH). Se incubaron aproximadamente 100 ng de cada uno de los fragmentos de DNA, incluyendo a *sigD* (control negativo), con concentraciones crecientes de la proteína purificada HilD, en un volumen total de 20  $\mu$ L. Se realizaron las reacciones de retardamiento en buffer de unión que contiene Tris pH

---

7.5 10 mM, KCl 50 mM, glicerol 2.5%, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y nP40 0.05%. Las interacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 20 min y enseguida el complejo proteína-DNA se separó en un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones no desnaturizantes en amortiguador de corrida Tris-boratos-EDTA 0.5X. Posteriormente se tiñeron los geles con una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/mL y se visualizaron en un transiluminador con luz UV de onda corta (Alpha-Imager UV transiluminator Innotech Corp).

### **5.12. Ensayo de invasión a células epiteliales**

El ensayo se realizó como lo describe Ibarra *et al.*, 2010 y Steele-Mortimer *et al.*, 1999 empleando células HeLa (células epiteliales cervicales humanas), las cuales se sembraron en placas de 24 pozos (Costar 3524, Corning Incorporated ®) conteniendo medio DMEM con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (By Products), de 20 a 24 horas antes de la infección para permitir su adhesión. Se colocaron las placas en una incubadora humidificada 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Se agregaron 10 X 10<sup>5</sup> células HeLa/pozo (1 mL/pozo) con una confluencia de 75-90%. Para la preparación de las bacterias, se estriaron las cepas evaluadas en cajas de LB con los antibióticos adecuados para obtener colonias aisladas. Se tomó una colonia y se colocaron pre-inóculos en 3 mL de LB con los antibióticos adecuados, se incubaron de 16-18 horas a 37°C con agitación de 200 rpm. Transcurrido ese tiempo, se transfirieron 600 µL de los pre-inóculos en matraces con 20 mL de LB sin antibióticos y se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm, hasta alcanzar una D.O<sub>600</sub> de 0.6-0.7 (dilución 1:5). Una vez que las bacterias alcanzaron la D.O<sub>600</sub> se centrifugó 1 mL de cultivo durante 2 min a 8,000 x g a temperatura ambiente. Enseguida se removieron cuidadosamente 900 µL del sobrenadante sin deshacer la pastilla celular. Después se resuspendieron las pastillas en 900 µL de PBS estéril 1X, se realizó una dilución 1:10 en DMEM (90 µL de DMEM + 10 µL de cultivo bacteriano). Se continuó añadiendo 10 µL de la dilución anterior, a cada uno de los pozos con células HeLa, se movió la placa para mezclar (este fue el tiempo 0). Enseguida se incubó la placa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se retiró el DMEM de cada uno de los pozos y se lavaron las monocapas de células 2 veces adicionando 1 mL de PBS estéril 1X a cada pozo, se agitó cuidadosamente la placa y se retiró el PBS. Una vez removido el PBS estéril 1X, se adicionó 1 mL de DMEM pre-calentado a 37°C en cada pozo, entonces se incubó la placa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 20 minutos. Transcurridos los 20 min, se eliminó el DMEM de cada pozo y se agregó 1 mL de DMEM suplementado con gentamicina (50 µg/mL) para eliminar las bacterias que no invadieron. Enseguida se incubó la placa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 1 hora. Después de este tiempo, se lavaron las monocapas de células HeLa 2 veces adicionando 1 mL de PBS estéril 1X a cada pozo. Se agitó cuidadosamente la placa y se removió el PBS. Enseguida se solubilizaron las monocapas de células HeLa adicionando 1 mL de solución de solubilización recién preparada, se pipeteó

---

la solución sobre las capas de células de 2-3 veces e inmediatamente se transfirió el mL a tubos eppendorf estériles, a partir de los cuales se realizaron diluciones seriales (1:10, 1:100 y 1:1000) en PBS estéril 1X. Se continuó plaqueando 10  $\mu$ L de cada dilución y de la solución directa sobre cajas Petri con LB (5 repeticiones para obtener un promedio). Estas cajas se incubaron a 37°C. Al siguiente día se contaron las colonias y los cálculos se hicieron tomando en cuenta los factores de dilución.

## 6. RESULTADOS.

### 6.1. HilD regula positivamente la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* cuando se crece a *S. Typhimurium* en medio LB

Para determinar si los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* son regulados por HilD, primero se construyeron fusiones transcripcionales de estos genes, considerando la región intergénica y un fragmento de la región codificante, al gen reportero *cat* (cloranfenicol acetil transferasa). Posteriormente, se determinó la expresión de estas fusiones, contenidas en los plásmidos pSL1770-*cat*, pSL1872-*cat*, pSL2438-*cat* y pSL1263-*cat*, en la cepa silvestre (WT) de *S. Typhimurium* SL1344 y en su derivada mutante  $\Delta$ *hilD*. Estudios previos han mostrado que HilD induce la expresión de sus genes blanco cuando *Salmonella* crece en la fase estacionaria, en LB (Lundberg *et al.*, 1999; Miao and Miller, 2000; Schechter *et al.*, 1999). En la fase estacionaria temprana (hora 4 de crecimiento) HilD induce la expresión de *rtsA* y de los genes de SPI-1 como *invF*, mientras que en la fase estacionaria tardía (hora 9 de crecimiento) induce la expresión de *ssrA/B* y por consiguiente de *ssaG* (SPI-2).

Como se muestra en la figura 9, la expresión de las fusiones *invF-cat* (control de SPI-1), *ssaG-cat* (control de SPI-2), *SL1770-cat*, *SL1872-cat* y *SL2438-cat* disminuyó en la mutante  $\Delta$ *hilD::Km*, con respecto a su expresión en la cepa WT, indicando que HilD regula positivamente la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438*. La fusión *SL1263-cat* mostró un nivel bajo de expresión (<100  $\mu$ mol/min/mg) en estas condiciones de crecimiento, lo cual, en nuestra experiencia, genera una alta variación en la cuantificación de la expresión de fusiones a *cat*. Por esta razón, aunque la expresión de la fusión *SL1263-cat* parece no afectarse en la mutante  $\Delta$ *hilD::Km*, no pudimos concluir en estos ensayos si HilD regula o no al gen *SL1263*.

Para confirmar el efecto de HilD sobre los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438*, se analizó la expresión de las fusiones *SL1770-cat*, *SL1872-cat* y *SL2438-cat* en la cepa WT y en su derivada mutante  $\Delta$ *hilD* que contienen el vector pMPM-K6 o el

---

plásmido pK6-HilD, el cual expresa a HilD bajo un promotor inducible por arabinosa. Como controles, se estudió también la expresión de las fusiones *hilA-cat* y *ssaG-cat*, ya que HilD induce la expresión de estas fusiones, a la hora 4 y a la hora 9 de crecimiento en medio LB, respectivamente. Para la inducción de la expresión de HilD a partir del plásmido pK6-HilD, se usó L-arabinosa al 0.001%.

La expresión de HilD a partir del plásmido pK6-HilD incrementó la expresión de las fusiones *hilA-cat*, *ssaG-cat*, *SL1770-cat*, *SL1872-cat* y *SL2438-cat* en la cepa  $\Delta hilD$ , al mismo nivel o incluso más alto con respecto a la cepa WT (Figura 10). Inclusive con la expresión de escape de HilD (en ausencia de arabinosa), a partir del plásmido pK6-HilD, se observó el incremento de la expresión de todas estas fusiones en la mutante  $\Delta hilD$  (Figura 10). Estos resultados indican que el efecto observado en la expresión de las fusiones *SL1770-cat*, *SL1872-cat* y *SL2438-cat* en la mutante  $\Delta hilD$  se debe, efectivamente, a la ausencia de HilD.

Para confirmar los resultados obtenidos con las fusiones transcripcionales se construyeron cepas de *S. Typhimurium* WT y  $\Delta hilD$  que expresan las proteínas SL1770, SL1872 y SL2438 etiquetadas con el epítotope 3X-FLAG, para su detección mediante ensayos de Western blot usando anticuerpos anti-FLAG. Esto se hizo mediante la técnica de mutagénesis por PCR (Datsenko and Wanner, 2000) modificada por Uzzau *et al.*, 2001.

La mutante *S. Typhimurium*  $\Delta hilD$  muestra una reducida secreción de las proteínas SipA, SipB, SipC y SipD, codificadas en SPI-1, pero no se afecta la secreción de FliC, una proteína flagelar cuya expresión y secreción no depende de HilD. Para confirmar que las cepas  $\Delta hilD/SL1770::3XFLAG$ ,  $\Delta hilD/SL1872::3XFLAG$  y  $\Delta hilD/SL2438::3XFLAG$ , carecen de HilD, se caracterizó su perfil de secreción de proteínas, el cuál nos comprueba que estas cepas carecen de HilD (Figura 11).

Así, para confirmar su regulación mediada por HilD se determinó la expresión, mediante ensayos de Western blot, de las proteínas SL1770-FLAG, SL1872-FLAG y SL2438-FLAG en las respectivas cepas WT y  $\Delta hilD$  crecidas en medio LB.

Como se muestra en la figura 12, la expresión de las proteínas SL1770-FLAG y SL1872-FLAG se disminuye en la cepa de *S. Typhimurium*  $\Delta hilD$ , con respecto a la cepa WT. Estos resultados indican que la expresión de las proteínas SL1770 y SL1872 está regulada por HilD en medio LB, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos por las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*.

En estos ensayos no pudimos detectar la expresión de la proteína SL2438-FLAG, lo cual concuerda con el hecho de que la fusión *SL2438-cat* mostró un nivel de

---

expresión menor al de las fusiones *SL1770-cat* y *SL1872-cat* (Figura 9 incisos A, B y C). La proteína SL1263 no se analizó, ya que dado el nivel tan bajo de expresión que mostró la fusión *SL1263-cat* (Figura 9 inciso D), muy probablemente no se hubiera podido detectar por Western blot.

En conjunto, estos resultados indican que los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* se regulan positivamente por HiID.

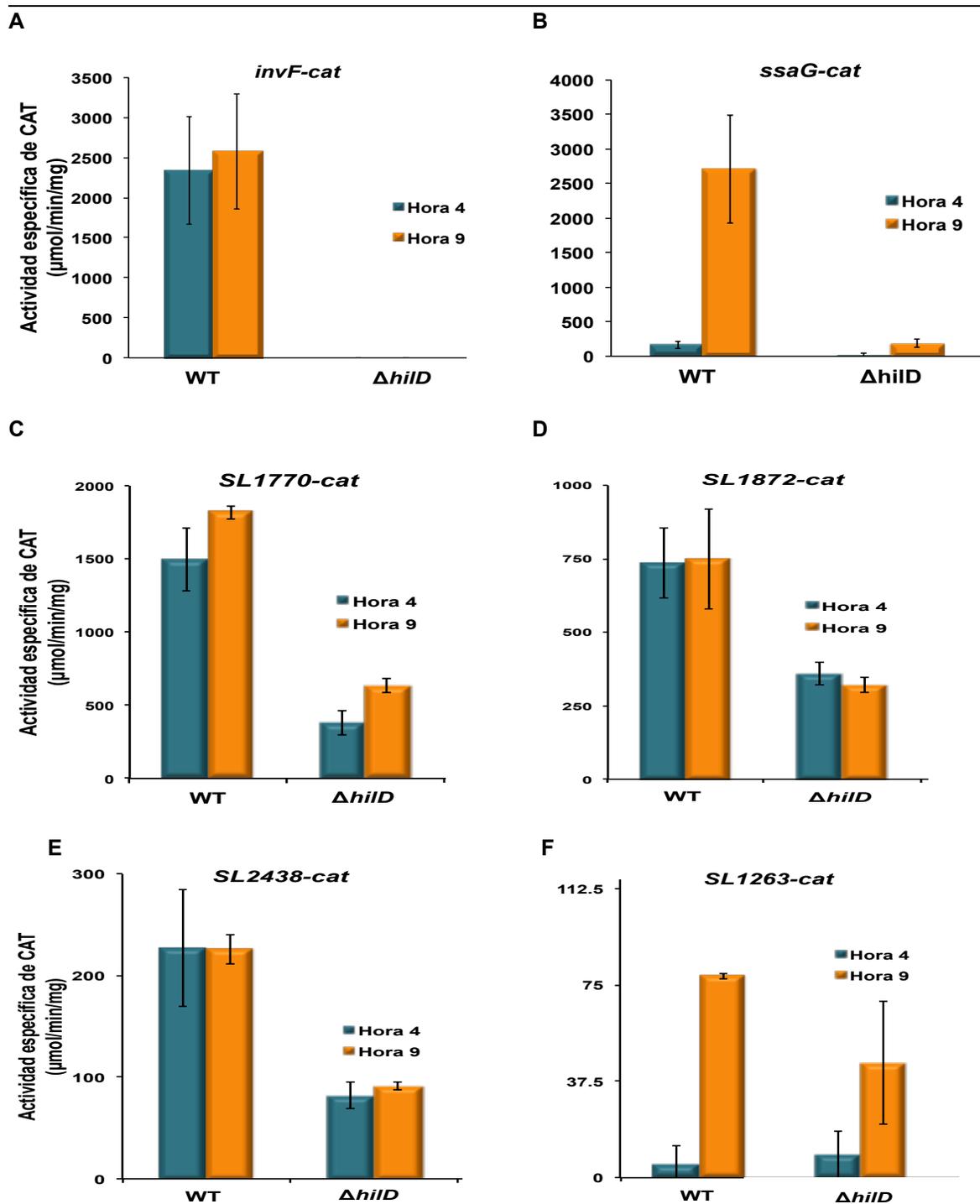


Figura 9. HilD regula positivamente la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* cuando se crece a *S. Typhimurium* en medio LB. La expresión de las fusiones transcripcionales *invF-cat* (A), *ssaG-cat* (B), *SL1770-cat* (C), *SL1872-cat* (D), *SL2438-cat* (E) y *SL1263-cat* (F), contenidas en los plásmidos *pinvF-cat*, *pssaG-cat*, *pSL1770-cat*, *pSL1872-cat*, *pSL2438-cat* y *pSL1263-cat* respectivamente, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium* y en su derivada mutante  $\Delta hilD::Km$ . Se cuantificó la actividad específica de CAT de las muestras tomadas a la hora 4 y 9 de los cultivos crecidos en medio LB a 37°C. *invF* es el control positivo de SPI-1 y *ssaG* de SPI-2. Los resultados muestran el promedio de 3 ensayos independientes realizados por duplicado. Las barras representan la desviación estándar.

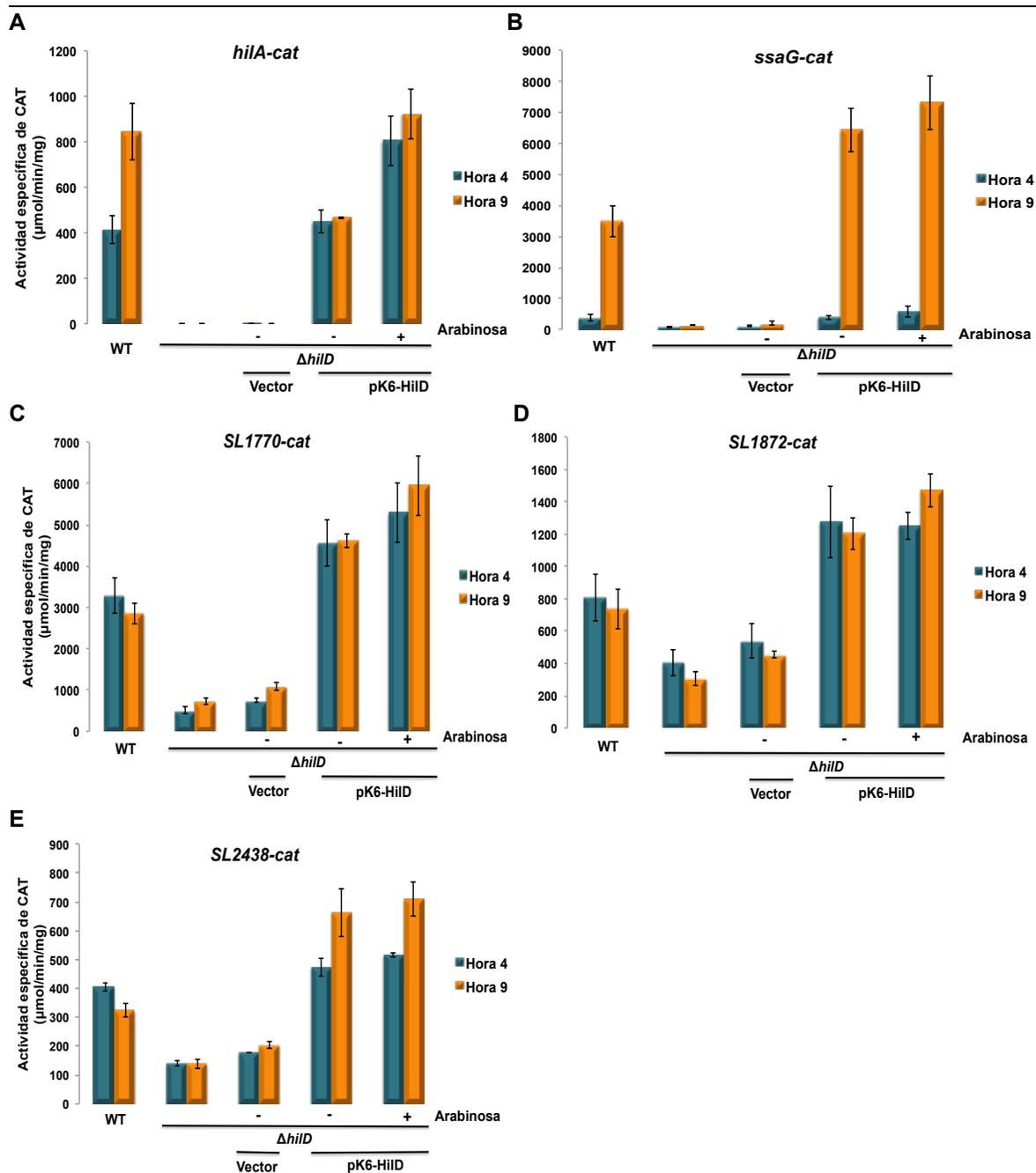


Figura 10. La expresión de HiID a partir del plásmido pK6-HiID restaura la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* en la cepa  $\Delta hilD$ . La expresión de las fusiones transcripcionales *hilA-cat* (A), *ssaG-cat* (B), *SL1770-cat* (C) *SL1872-cat* (D) y *SL2438-cat* (E) se midió en la cepa WT de *S. Typhimurium* y en sus derivada mutante  $\Delta hilD$  conteniendo el vector pMPM-K6 o el plásmido pK6-HiID, el cual expresa a la proteína HiID bajo un promotor inducible por arabinosa. Se determinó la actividad específica de CAT de las muestras tomadas a la hora 4 y 9 de los cultivos crecidos en medio LB a 37°C. Se utilizó L-arabinosa al 0.001%. Los resultados muestran el promedio de 3 ensayos independientes realizados por duplicado. Las barras representan la desviación estándar.

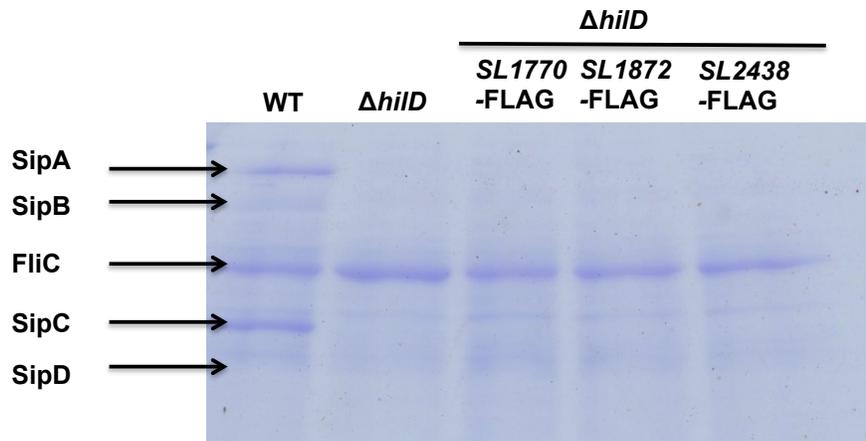


Figura 11. Perfil de proteínas secretadas de las cepas de *S. Typhimurium* WT y sus derivadas mutantes *ΔhilD SL1770::3XFLAG*, *ΔhilD SL1872::3XFLAG* y *ΔhilD SL2438::3XFLAG*. Las proteínas secretadas se obtuvieron del sobrenadante de cultivos de estas cepas, así como de *S. Typhimurium* WT y sus derivadas en la mutante *ΔhilD*, crecidos en medio LB a 37°C, durante 9 horas. La cepa WT muestra el típico perfil de secreción de proteínas efectoras codificadas en SPI-1, SipA, SipB, SipC y SipD. FliC es una proteína flagelar cuya secreción es independiente de SPI-1.

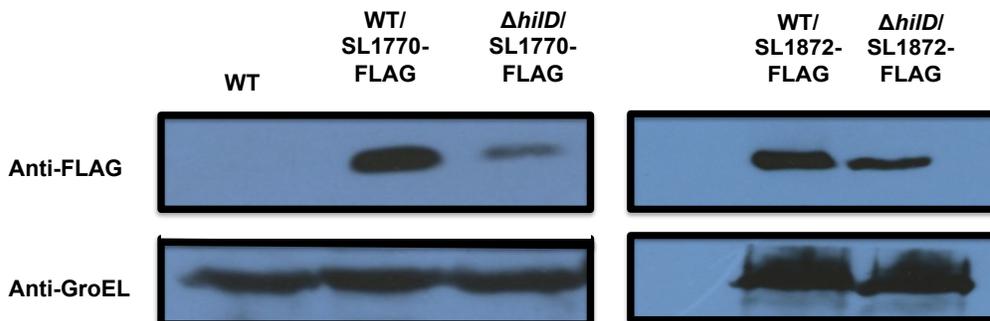


Figura 12. La expresión de las proteínas SL1770-FLAG y SL1872-FLAG se disminuye en la cepa *ΔhilD* cuando se crece a *S. Typhimurium* en LB. Los extractos totales de proteínas de las cepas WT, WT/*SL1770::3XFLAG*, *ΔhilD/SL1770::3XFLAG*, WT/*SL1872::3XFLAG* y *ΔhilD/SL1872::3XFLAG*, crecidas en medio LB a 37°C, durante 4 horas, se analizaron mediante Western blot usando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Como control de carga, se detectó GroEL utilizando un anticuerpo policlonal anti-GroEL.

---

## 6.2. HilD regula la expresión de los genes *SL1770*, *SL2438* y *SL1872* de manera indirecta

Para definir si HilD regula directamente a los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438*, o lo hace a través de otro regulador de *S. Typhimurium*, se analizó la expresión de las fusiones *SL1770-cat*, *SL1872-cat* y *SL2438-cat* en la cepa de *E. coli* MC4100 conteniendo el vector pMPM-K6 o el plásmido pK6-HilD. Además, se analizó también la expresión de las fusiones *hilA-cat* y *ssaG-cat*, como control positivo y negativo, respectivamente, ya que HilD regula directamente a *hilA* e indirectamente a *ssaG*.

Para la inducción de la expresión de HilD a partir del plásmido pK6-HilD, se utilizó L-arabinosa al 0.001%. A concentraciones mayores de arabinosa se afectó el crecimiento de *E. coli*, lo cual no favoreció la expresión de las fusiones probadas.

La inducción de HilD incrementó la expresión de la fusión *hilA-cat*, pero no de las fusiones *ssaG-cat*, *SL1770-cat*, *SL1872-cat* y *SL2438-cat* en *E. coli* (Figura 13). Estos resultados sugieren que HilD regula la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* de forma indirecta, a través de un regulador presente en *S. Typhimurium* pero no en *E. coli*.

Para confirmar si HilD regula a los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* indirectamente, se analizó la interacción de HilD con la región reguladora de estos genes. Esto se hizo mediante EMSAs (Electrophoretic Mobility Shift Assays), usando la región reguladora contenida en las respectivas fusiones transcripcionales de estos genes y la proteína MBP-HilD purificada, la cual en EMSAs se une de manera específica al DNA (Bustamante *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2014). Se utilizaron las regiones reguladoras de *hilA* y *sigD*, como controles positivo y negativo, respectivamente. La proteína MBP-HilD se unió al fragmento de DNA de *hilA*, pero no a los de *sigD*, *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* (Figura 14).

Así, en conjunto estos resultados indican que HilD regula indirectamente la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438*.

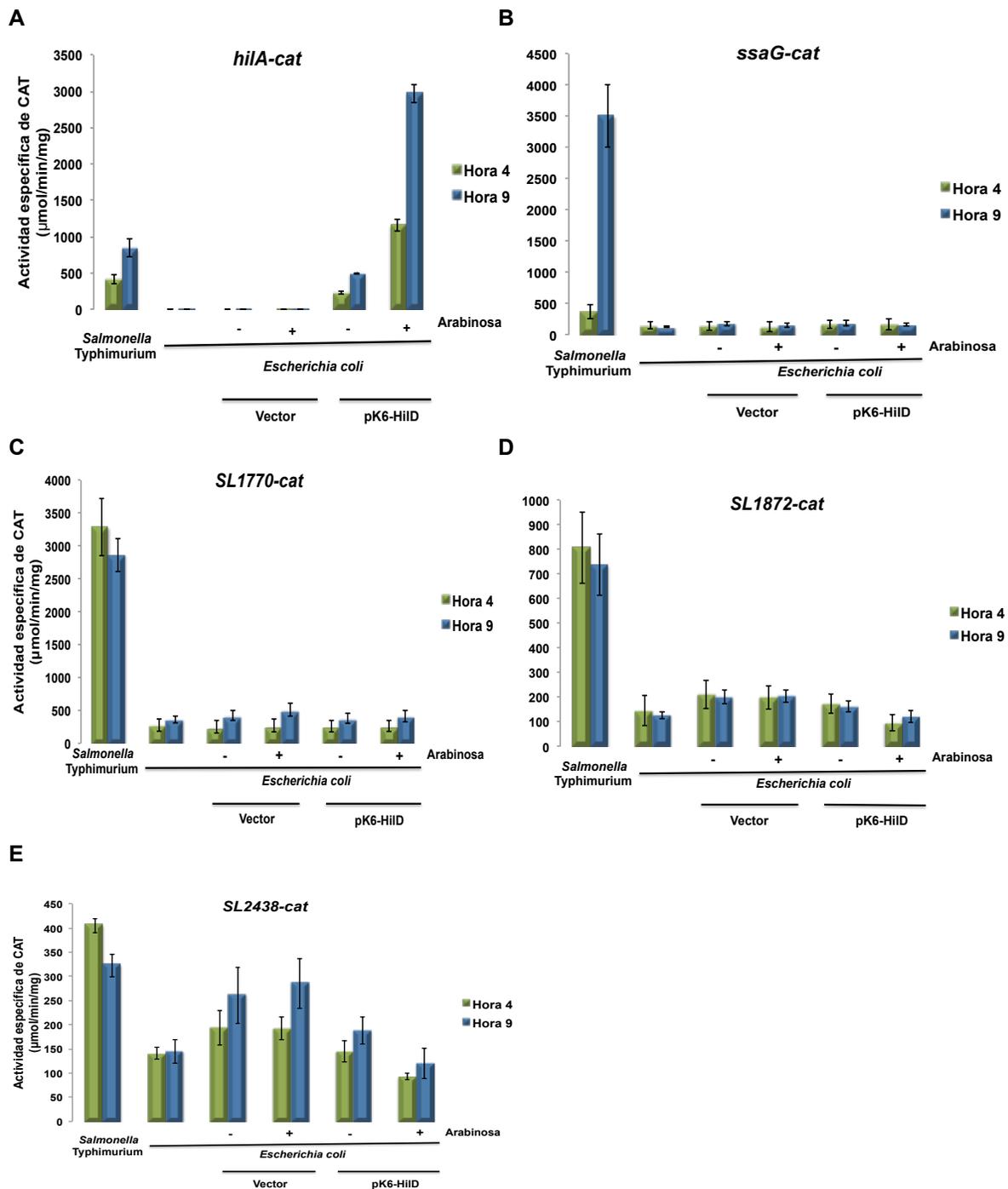


Figura 13. HiID no induce la expresión de las fusiones *SL1770-cat*, *SL1872-cat* y *SL2438-cat* en *E. coli* K12. La expresión de las fusiones transcripcionales *hila-cat* (A), *ssaG-cat* (B), *SL1770-cat* (C), *SL1872-cat* (D) y *SL2438-cat* (E); contenidas en los plásmidos *phiA-cat*, *pssaG-cat*, *pSL1770-cat*, *pSL1872-cat* y *pSL2438-cat*, respectivamente, se monitoreó en la cepa de *S. Typhimurium* WT, así como en *E. coli* MC4100 conteniendo el vector *pMPM-K6* o el plásmido *pK6-HiID*, el cual expresa a la proteína HiID bajo un promotor inducible por arabinosa. La actividad específica de CAT se determinó tomando muestras a la hora 4 y 9 de cultivos bacterianos crecidos en LB a 37°C. Se utilizó L-arabinosa al 0.001%. Se muestra el promedio de los resultados de 3 ensayos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

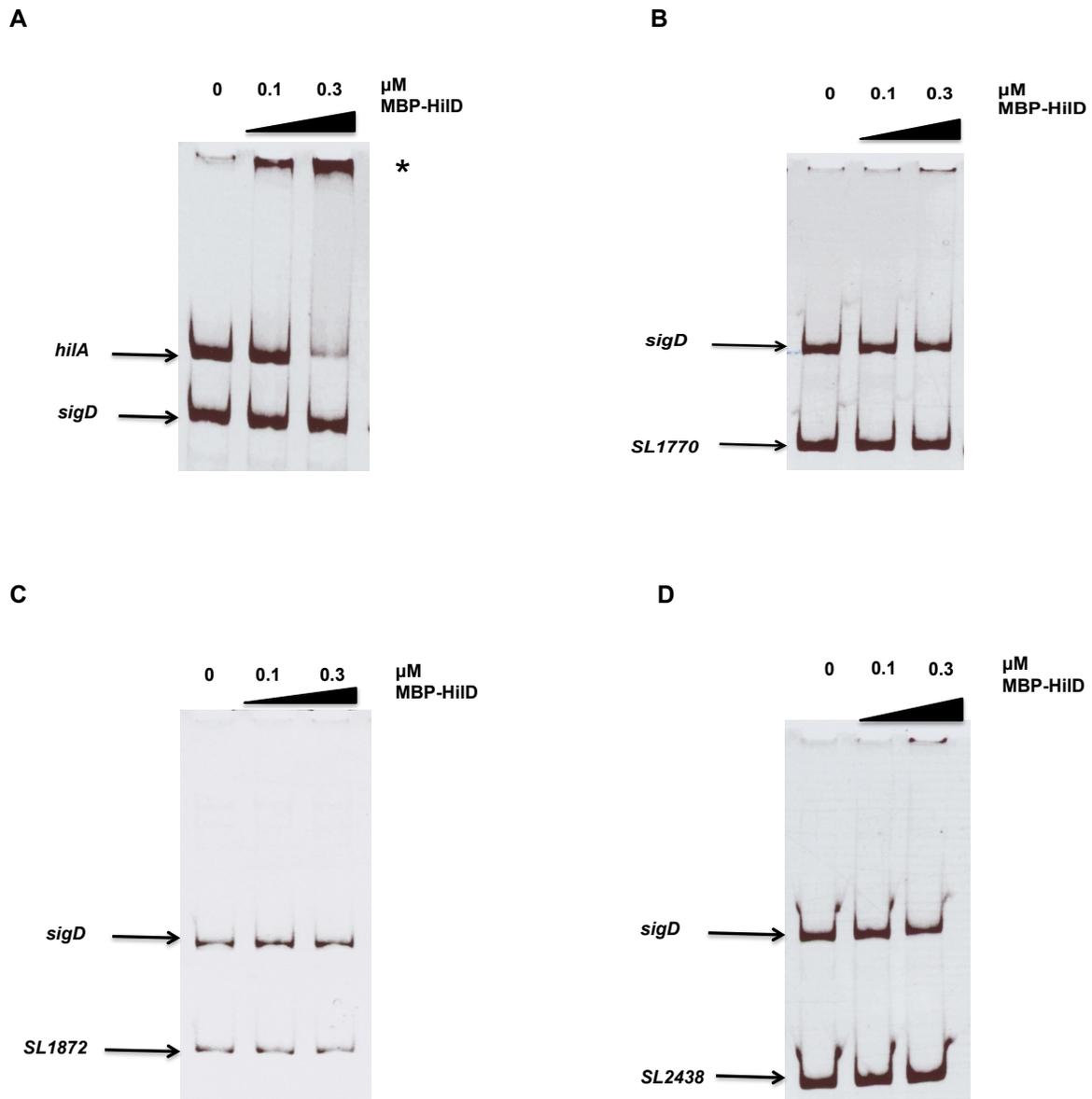


Figura 14. HiID no interactúa con la región reguladora de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438*. Se realizaron EMSA's con las regiones reguladoras de los genes *hilA* (A), *sigD* (A-D), *SL1770* (B), *SL1872* (C) y *SL2438* (D), amplificadas por PCR y la proteína MBP-HiID. Se incubaron los fragmentos de DNA con concentraciones crecientes de la proteína purificada MBP-HiID. *hilA* se empleó como control positivo y *sigD* como control negativo. Los complejos DNA-proteína (indicados con un asterisco) se analizaron en geles de poliacrilamida 6% teñidos con bromuro de etidio.

---

### **6.3. HilD, pero no HilA o InvF regula positivamente la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438***

Una vez que confirmamos la regulación indirecta por HilD de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438*, nos propusimos analizar si esta regulación se lleva a cabo a través de la cascada que involucra a HilA e InvF. Para esto se determinó la expresión de las fusiones transcripcionales *SL1770-cat*, *SL1872-cat*, *SL2438-cat* y *SL1263-cat* en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y en sus derivadas mutantes  $\Delta hilD::Km$ ,  $\Delta hilA::Km$  y  $\Delta invF::Km$ . Como se muestra en la figura 15, la expresión de las fusiones *SL1770-cat*, *SL1872-cat* y *SL2438-cat* disminuyó en la mutante  $\Delta hilD::Km$ , con respecto a su expresión en la cepa WT, pero no se afectó en las mutantes  $\Delta hilA::Km$  y  $\Delta invF::Km$ .

Estos resultados muestran que HilA e InvF no están involucrados en la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438*, lo cual indica que HilD controla la expresión de éstos a través de otro regulador.

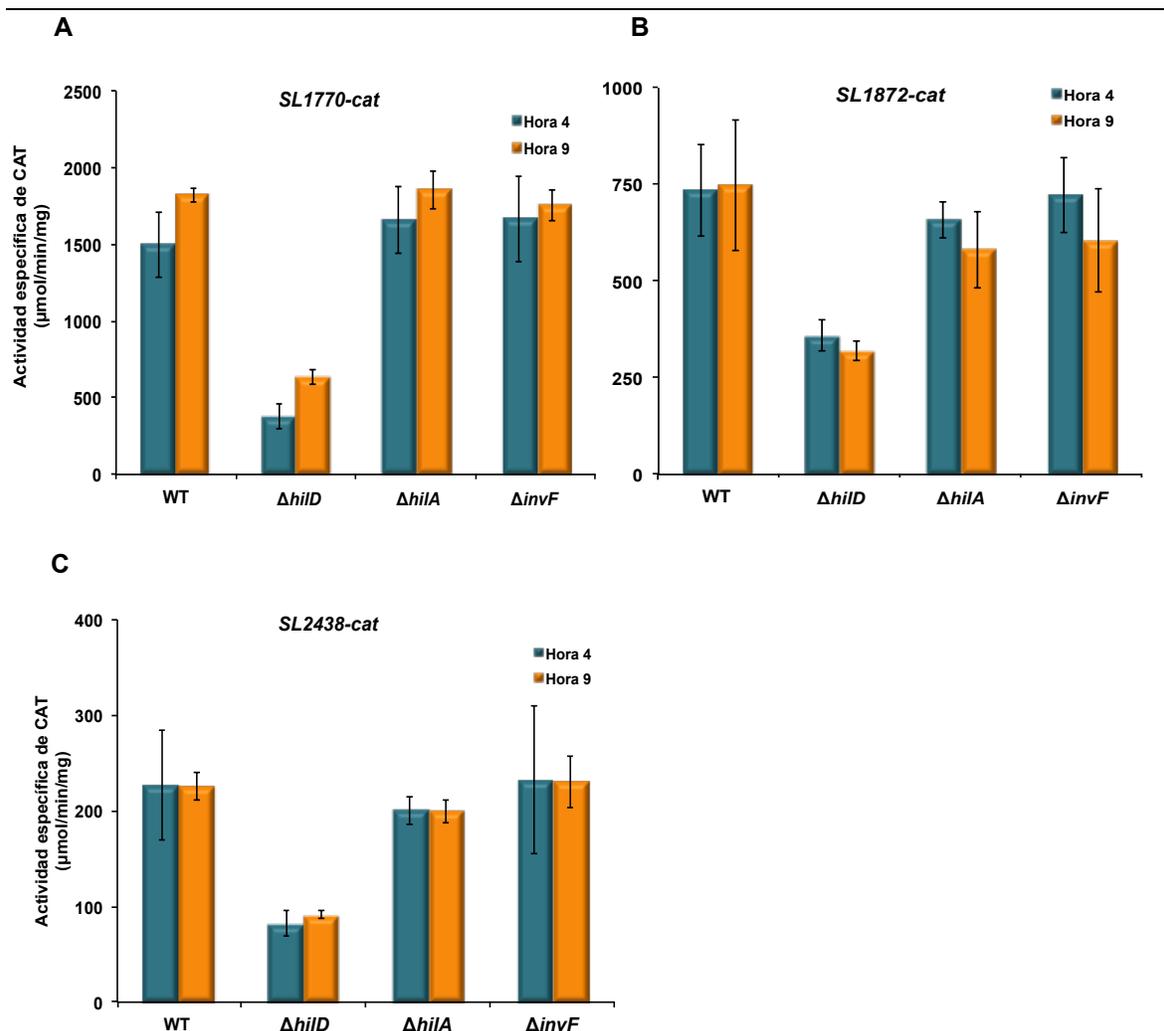


Figura 15. *HilD* no regula la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* a través de *HilA* o *InvF* en medio LB. La expresión de las fusiones transcripcionales *SL1770-cat* (A) *SL1872-cat* (B) y *SL2438-cat* (C) contenidas en los plásmidos pSL1770-cat, pSL1872-cat y pSL2438-cat respectivamente, se midió en la cepa WT de *S. Typhimurium* y en sus derivadas mutantes  $\Delta hilD::Km$ ,  $\Delta hilA::Km$  y  $\Delta invF::Km$ . Se determinó la actividad específica de CAT de las muestras tomadas a la hora 4 y 9 de los cultivos crecidos en medio LB a 37°C. Los resultados muestran el promedio de 3 ensayos independientes realizados por duplicado. Las barras representan la desviación estándar.

#### 6.4. La expresión de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* se induce en medio MM-N

Los genes de SPI-1, como *invF*, se expresan en medio LB pero no en medio mínimo, mientras que los genes de SPI-2, que incluye a *ssaG*, se expresan a la hora 9 del crecimiento en LB y también en medio mínimo o MM-N (Figura 16).

Para determinar si los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* tienen un patrón de expresión similar al de los genes de SPI-1, es decir se expresan en LB pero no en medio mínimo, se analizó la expresión de las fusiones *SL1770-cat*, *SL1872-cat* y *SL2438-cat* en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* crecida en LB o en MM-N. Del

medio LB se tomaron muestras a las horas 4 y 9 de crecimiento, y del MM-N a la hora 15. Sorpresivamente, todas estas fusiones se expresaron en medio MM-N, a un nivel incluso mayor al de su expresión en LB (Figura 17). De manera interesante, en medio MM-N la fusión *SL1263-cat* se expresó notablemente (Figura 17), indicando que el medio mínimo, pero no el medio LB, es una condición de crecimiento que favorece su expresión.

Estos resultados indican que los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* se expresan tanto en medio LB como en medio MM-N, en cambio la expresión del gen *SL1263* sólo se induce en medio MM-N.

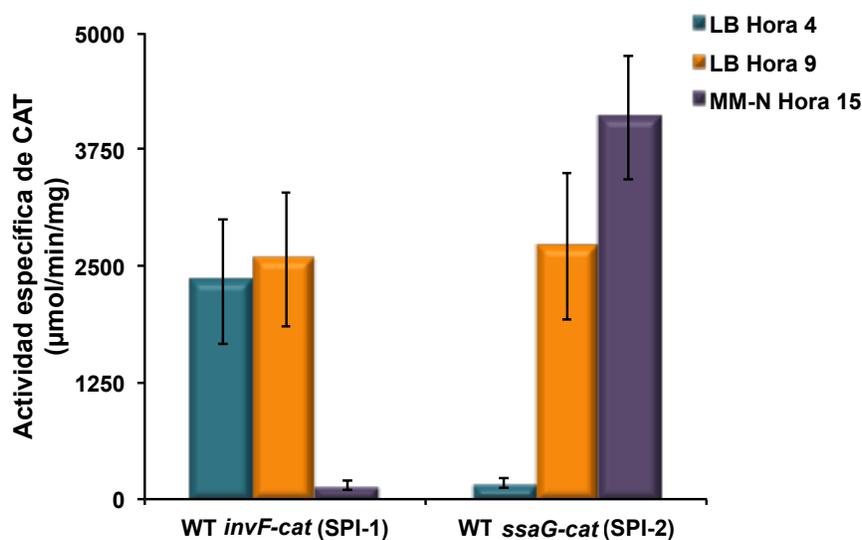


Figura 16. Expresión diferencial de los genes *invF* (SPI-1) y *ssaG* (SPI-2) en LB y MM-N. La expresión de las fusiones transcripcionales *invF-cat* y *ssaG-cat*; contenidas en los plásmidos *pinvF-cat* y *pssaG-cat*, respectivamente, se monitoreó en la cepa de *Salmonella* Typhimurium WT. Se determinó la actividad específica de CAT de las muestras tomadas a la hora 4 y 9 de los cultivos crecidos en medio LB y a la hora 15 en medio MM-N a 37°C. Los resultados muestran el promedio de 3 ensayos independientes realizados por duplicado. Las barras representan la desviación estándar.

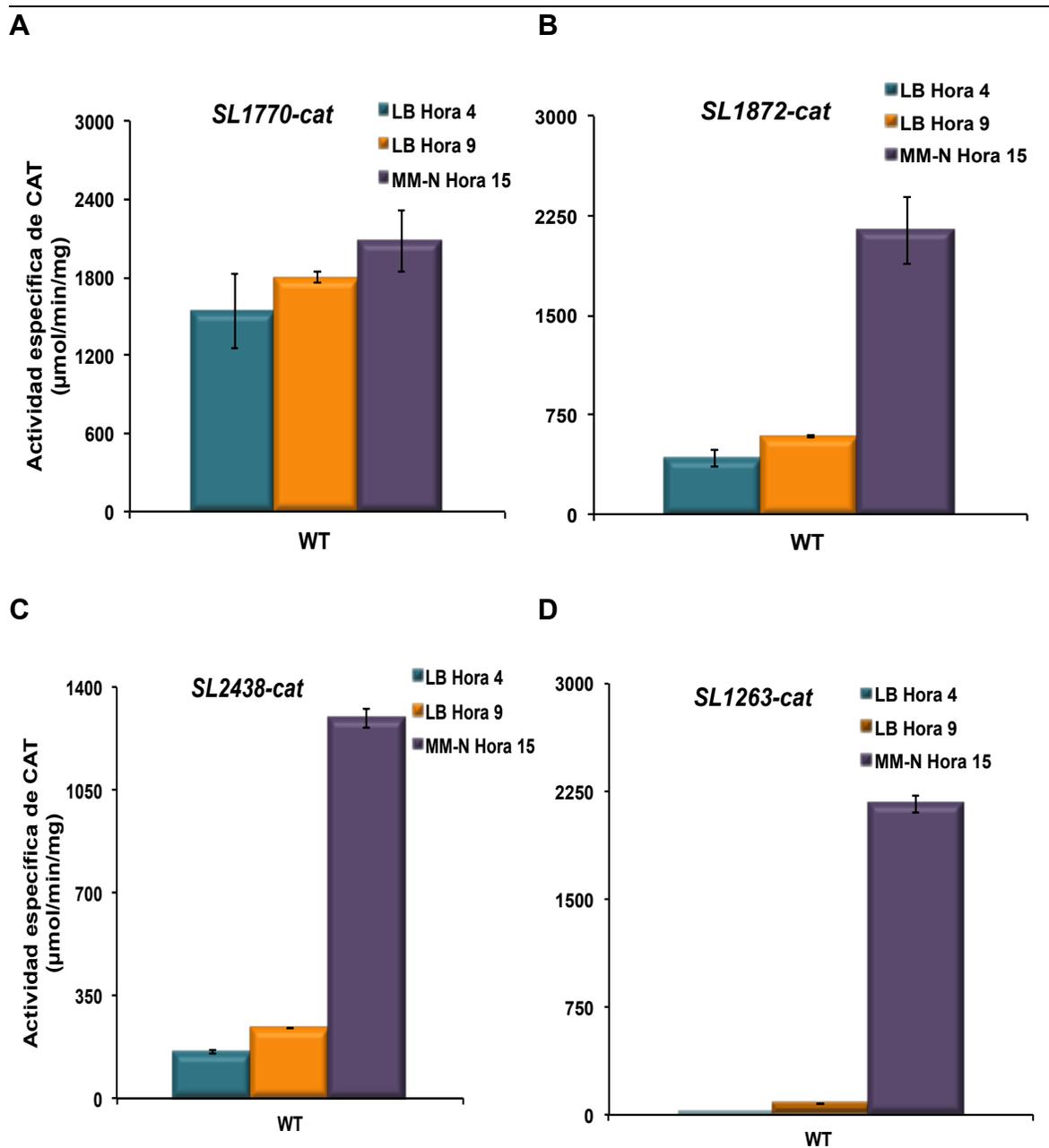


Figura 17. La expresión de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* se induce en medio MM-N. La expresión de las fusiones transcripcionales *SL1770-cat* (A) *SL1872-cat* (B), *SL2438-cat* (C) y *SL1263-cat* (D) contenidas en los plásmidos pSL1770-cat, pSL1872-cat, pSL2438-cat y pSL1263-cat respectivamente, se midió en la cepa WT de *S. Typhimurium*. Se determinó la actividad específica de CAT de las muestras tomadas a la hora 4 y 9 de los cultivos crecidos en medio LB y a la hora 15 en MM-N a 37°C. Los resultados muestran el promedio de 3 ensayos independientes realizados por duplicado. Las barras representan la desviación estándar.

---

### **6.5. La regulación de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* es independiente de *HilD* en MM-N**

Aunque se sabe que *HilD* es funcional cuando *Salmonella* crece en LB y no en MM-N, quisimos confirmar si la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* es independiente de *HilD* en MM-N.

Para esto, se determinó la expresión de las fusiones *SL1770-cat*, *SL1872-cat*, *SL2438-cat* y *SL1263-cat* en la cepa *S. Typhimurium* WT y en su derivada mutante  $\Delta hilD::Km$  crecidas en medio MM-N y, como control, también en LB.

Como se muestra en la figura 18, la expresión de las fusiones *SL1770-cat*, *SL1872-cat*, *SL2438-cat* y *SL1263-cat* se afectó en la mutante  $\Delta hilD::Km$  crecida en LB, pero no en MM-N.

Estos resultados indican que la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* en medio MM-N se induce por una vía independiente de *HilD*.

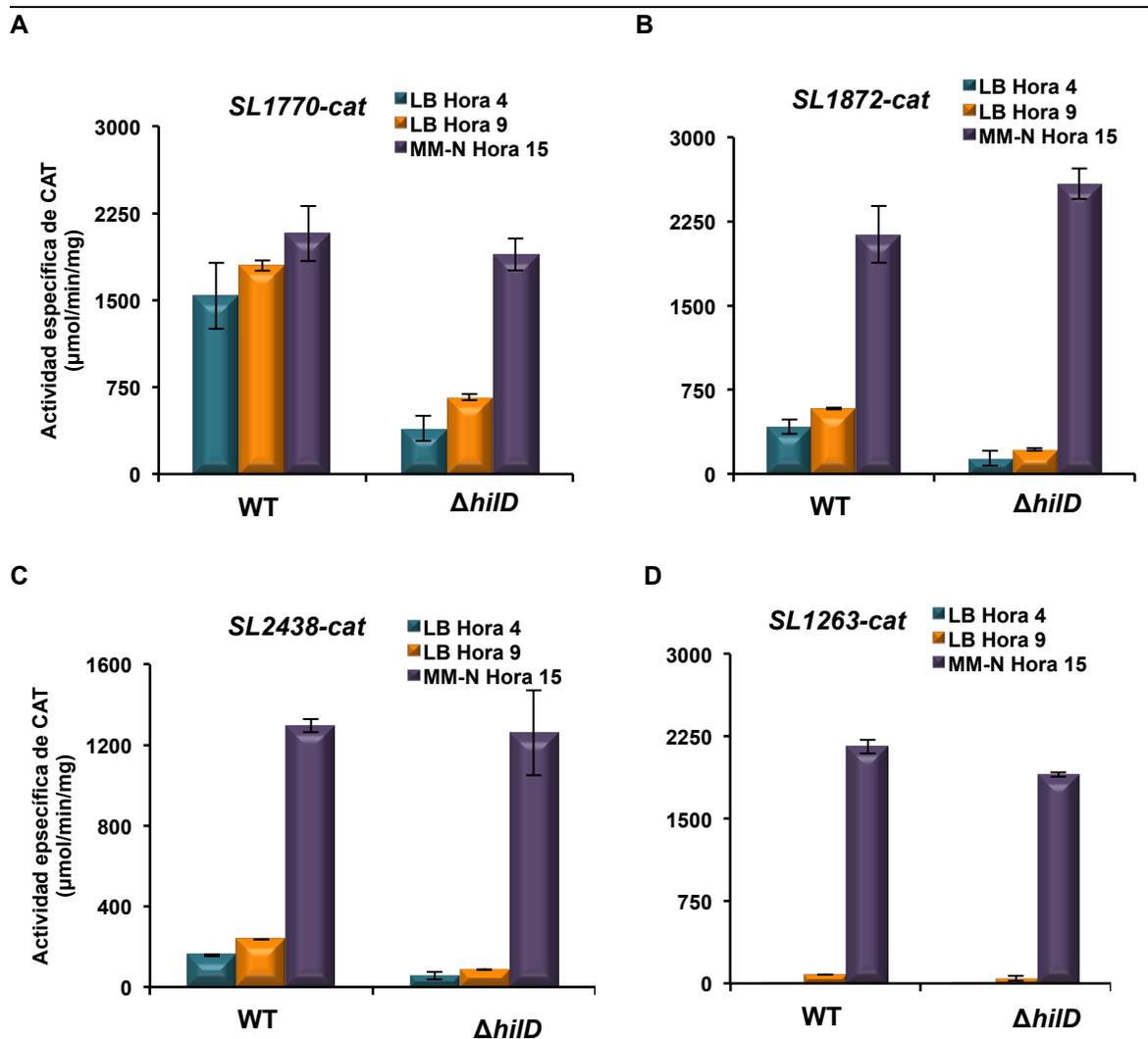


Figura 18. La regulación de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* en MM-N es independiente de *HilD*. La expresión de las fusiones transcripcionales *SL1770-cat* (A) *SL1872-cat* (B), *SL2438-cat* (C) y *SL1263-cat* (D) contenidas en los plásmidos pSL1770-cat, pSL1872-cat, pSL2438-cat y pSL1263-cat respectivamente, se midió en la cepa WT de *S. Typhimurium* y su derivada mutante  $\Delta hilD::Km$ . Se determinó la actividad específica de CAT de las muestras tomadas a la hora 4 y 9 de los cultivos crecidos en medio LB y a la hora 15 en MM-N a 37°C. Los resultados muestran el promedio de 3 ensayos independientes realizados por duplicado. Las barras representan la desviación estándar.

---

## **6.6. La regulación de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* es independiente de SsrA/B**

El sistema de dos componentes SsrA/B es uno de los reguladores activos cuando *Salmonella* crece en medio MM-N (Deiwick *et al.*, 1999). En esta condición de crecimiento, SsrA/B induce la expresión de los genes de SPI-2 como *ssaG*.

Para determinar si SsrA/B está involucrado en la expresión de las fusiones *SL1770-cat*, *SL1872-cat*, *SL2438-cat* y *SL1263-cat* en medio MM-N, y posiblemente en LB, se cuantificó la actividad de CAT de estas fusiones en la cepa WT y en su derivada mutante  $\Delta$ *ssrB::Km* crecidas en medio MM-N y LB.

La expresión de la fusión *ssaG-cat* (control positivo) se disminuye en la mutante  $\Delta$ *ssrB::Km*, en cambio, las fusiones *SL1770-cat*, *SL1872-cat*, *SL2438-cat* y *SL1263-cat* no mostraron diferencia con respecto a la cepa silvestre, en ninguno de los dos medios de cultivo analizados (Figura 19).

Estos resultados indican, que el sistema de dos componentes SsrA/B, no está involucrado en la regulación de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* en estas condiciones de crecimiento.

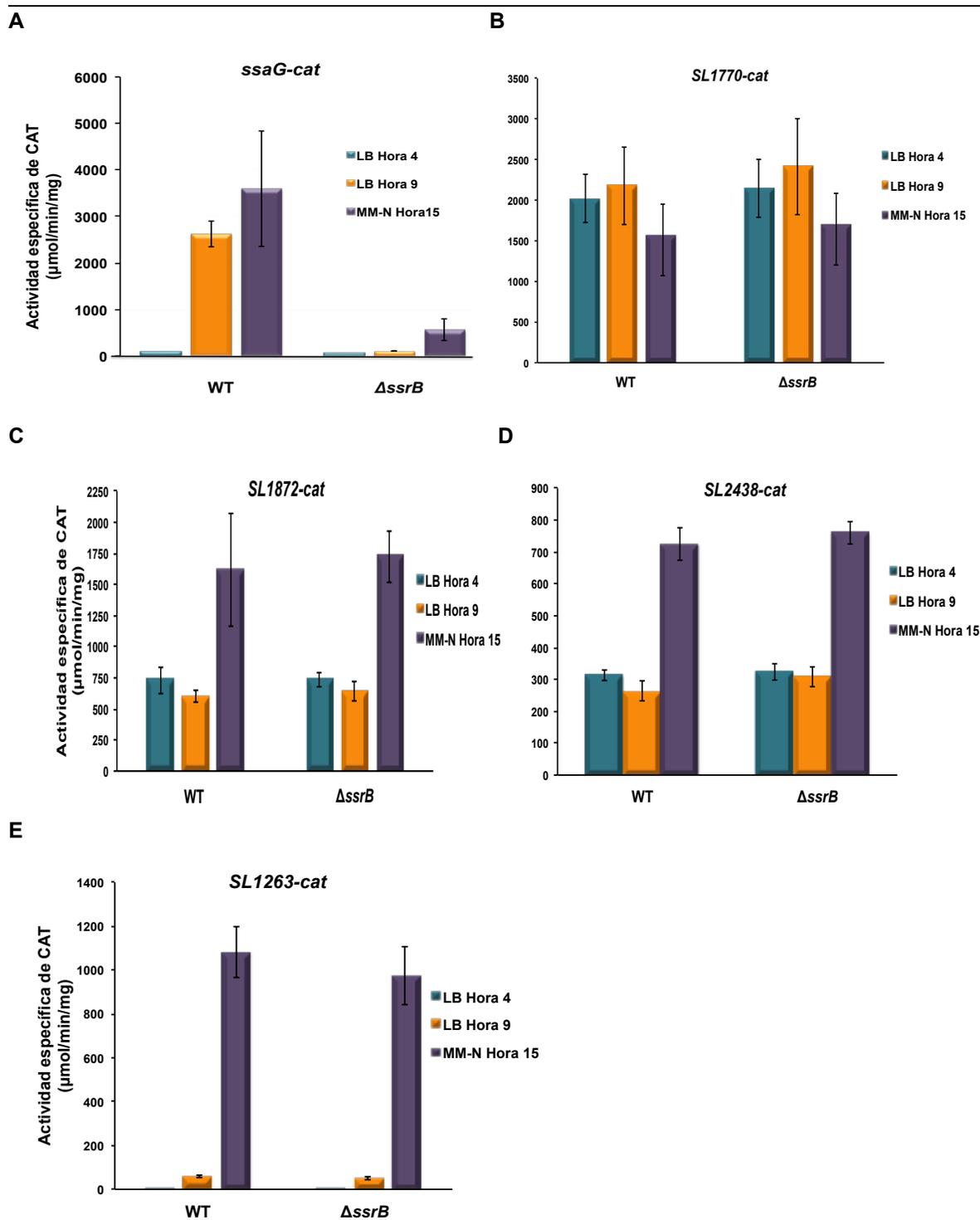


Figura 19. La expresión de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* es independiente de SsrA/B. La expresión de las fusiones transcripcionales *ssaG-cat* (A), *SL1770-cat* (B), *SL1872-cat* (C), *SL2438-cat* (D) y *SL1263-cat* (E), contenidas en los plásmidos pssaG-cat, pSL1770-cat, pSL1872-cat, pSL2438-cat y pSL1263-cat, respectivamente, se midió en la cepa WT de *S. Typhimurium* y su derivada mutante  $\Delta ssrB::Km$ . *ssaG* se empleó como control positivo. Se determinó la actividad específica de CAT de las muestras tomadas a la hora 4 y 9 de los cultivos crecidos en medio LB y a la hora 15 en MM-N a 37°C. Los resultados muestran el promedio de 3 ensayos independientes realizados por duplicado. Las barras representan la desviación estándar.

## 6.7. Los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* no forman parte del SST3 de SPI-1

Para comenzar a analizar la posible función de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* se construyeron cepas mutantes que carecen de estos genes utilizando el método descrito por Datsenko y Wanner (Datsenko and Wanner, 2000). Para confirmar la ausencia de estos genes se caracterizaron por PCR las cepas  $\Delta SL1770::km$ ,  $\Delta SL1872::Km$  y  $\Delta SL2438::km$ .

Después de obtener las cepas mutantes  $\Delta SL1770::km$ ,  $\Delta SL1872::km$  y  $\Delta SL2438::km$ , se determinó el perfil de proteínas secretadas de estas cepas crecidas en medio LB. Cuando *Salmonella* crece en LB se puede detectar en el medio de cultivo la secreción de las proteínas efectoras de SPI-1 SipA, SipB, SipC y SipD, mediante geles de proteínas teñidos con colorante azul brillante de Coomassie. Asimismo, se detecta también en el medio de cultivo a la proteína FliC, la cual es la subunidad principal del flagelo, cuya expresión y secreción no depende de SPI-1.

Como se muestra en la figura 20, las cepas  $\Delta SL1770::km$ ,  $\Delta SL2438::km$  y *SL1770::3XFLAG-km* tuvieron un perfil de secreción de proteínas similar al de la cepa WT; en contraste, en la mutante  $\Delta hilD$  solo se observó la presencia de la proteína FliC. Estos resultados indican que los genes *SL1770*, *SL2438* y *SL1872* no se requieren para el funcionamiento del SST3 de SPI-1.

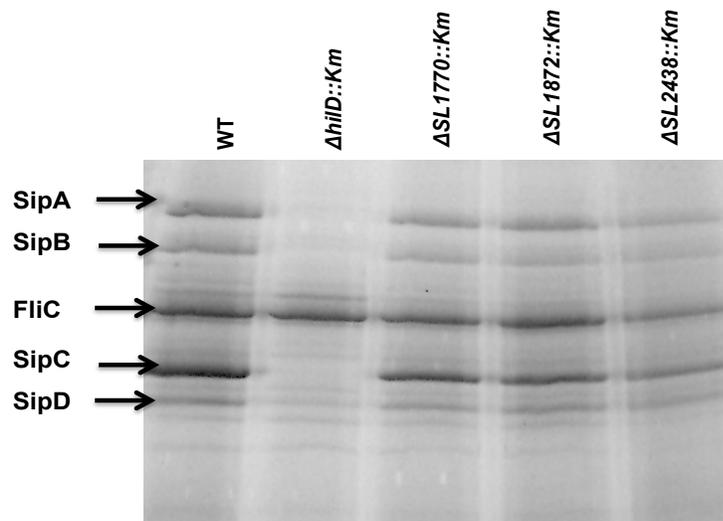


Figura 20. Los genes *SL1770*, *SL2438* y *SL1872* no se requieren para la secreción de proteínas dependientes de SPI-1. El sobrenadante de cultivos de las cepas de *S. Typhimurium* WT y sus derivadas mutantes  $\Delta SL1770$ ,  $\Delta SL2438$  y  $\Delta SL1872$  que se crecieron en medio LB a 37°C durante 9 horas, se utilizaron para analizar la secreción de proteínas efectoras codificadas en SPI-1, SipA, SipB, SipC y SipD. FliC es una proteína flagelar de la cual su secreción es independiente de SPI-1.

## 6.8. Los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* se requieren para la invasión a células epiteliales

Con el fin de determinar si los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* se requieren para la invasión de *S. Typhimurium* a células epiteliales, se determinó el fenotipo de invasión a células HeLa de las mutantes  $\Delta SL1770$ ,  $\Delta SL1872$  y  $\Delta SL2438$ . Como control, se analizó también la mutante  $\Delta hilD$ , la cual, al no expresar a los genes de SPI-1, está afectada en el fenotipo de invasión.

Interesantemente, las mutantes  $\Delta SL1770$ ,  $\Delta SL1872$  y  $\Delta SL2438$  mostraron una reducción de alrededor de 5 veces en la invasión a células HeLa, con respecto a la cepa WT; mientras que, como era esperado, no se detectó invasión de la mutante  $\Delta hilD$  (Figura 21). Estos resultados indican que los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* están involucrados en la invasión a células HeLa.

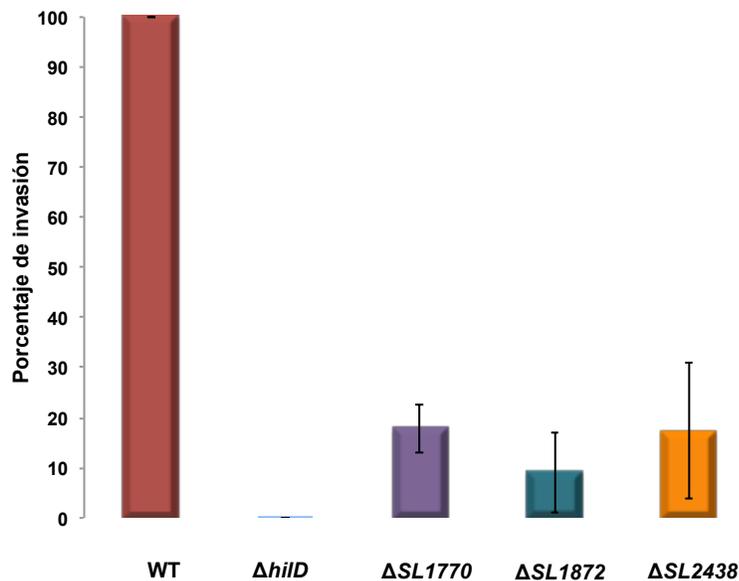


Figura 21. Los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* son necesarios para la invasión de *S. Typhimurium* a células HeLa. Se infectaron células HeLa con las cepas WT,  $\Delta hilD$ ,  $\Delta SL1770$ ,  $\Delta SL1872$  y  $\Delta SL2438$ . Después de una hora de la infección, las células HeLa se lisaron y las bacterias intracelulares se recuperaron en cajas con medio LB para su posterior conteo. Las barras muestran el error estándar de la media de dos ensayos independientes realizados por triplicado. La invasión se expresa en porcentaje.

---

## 7. DISCUSIÓN.

El regulador HilD regula diferentes genes de virulencia de *Salmonella*, los cuáles están involucrados en los mecanismos que conducen a una enterocolitis. Nuestros resultados muestran que HilD regula positivamente la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* cuando *S. Typhimurium* crece en LB. Esto confirma los resultados obtenidos en el análisis de transcriptomas por RNAseq del grupo del Dr. Jay Hinton (Tabla 2), donde se crecieron a las cepas de *S. Typhimurium* en medio rico Lenox. Adicionalmente, nuestros resultados señalan que HilD no regula la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* de forma directa, como tampoco lo hace a través de la cascada de regulación que forma con HilA e InvF. Más aún, nuestros resultados revelaron que HilD induce la expresión de estos genes a través de otro regulador presente en *S. Typhimurium*, pero no en *E. coli* K12 .

HilD induce la expresión del regulador HilC, codificado en SPI-1, así como de RtsA, SinR y SsrA/B codificados fuera de esta isla de patogenicidad (Petrone *et al.*, 2014; Bustamante *et al.*, 2008; Pérez-Morales, D., datos no publicados).

HilC y RtsA son miembros de la familia de reguladores AraC y tienen homología con HilD en su dominio de unión a DNA en un 62 y 61%, respectivamente. Se unen a sitios similares del DNA, por lo que hay un traslape de genes en su regulón. HilD y HilC regulan la expresión de *ytfK*, un gen de función desconocida, y de *siiE*, gen localizado en SPI-4 que codifica para una proteína efectora. Sin embargo, RtsA no tiene efecto sobre estos genes, lo cual indica que hay una sutil diferencia en la secuencia de unión a DNA de HilD, HilC y RtsA (Petrone *et al.*, 2014; Main-Hester *et al.*, 2008). Por lo que podría ser que HilD indujera la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* a través de RtsA, o inclusive de HilC.

Otro candidato para estar involucrado en la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* mediada por HilD es SinR, el cual es un regulador transcripcional de la familia LysR (LTTRs) que consta de 315 a.a. y está codificado en la SPI-6 (Groisman *et al.*, 1993; Folkesson *et al.*, 2002; Mulder *et al.*, 2012). Los miembros de esta familia representan el primer mecanismo de regulación catabólica en bacterias, pero también regulan genes involucrados en virulencia o adaptación, como son formación del biofilm, motilidad, señalización, producción de metabolitos secundarios y estrés oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Maddocks and Oyston, 2008; Tropel and van der Meer, 2004). SinR se encuentra conservado en las serovariedades de *Salmonella* que infectan

---

animales de sangre caliente (Folkesson *et al.*, 1999). Una cepa mutante en SPI-6 disminuye la capacidad de *Salmonella* de invadir células HEp-2, el cual es un fenotipo asociado a genes regulados por HilD (Folkesson *et al.*, 2002).

El sistema de dos componentes SsrA/B, se localiza en SPI-2 e induce la expresión de los genes que conforman esta SPI (Fàbrega and Vila, 2013), nuestros ensayos indican que SsrA/B no se requiere en medio LB para regular la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438*

Por lo tanto, queda por definirse el regulador por medio del cual HilD induce la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438*. En la figura 22, panel A, se muestra un modelo propuesto para este sistema de regulación.

De manera interesante, nuestros resultados muestran que la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* se induce en medio mínimo, incluso a un nivel mayor que su expresión en medio LB. En el caso del gen *SL1263*, esto indica que la fusión *SL1263-cat* contiene los elementos necesarios para su expresión y que en medio LB es muy reducida.

La expresión de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* en medio mínimo no depende de HilD. Esto es consistente con los estudios previos que indican que HilD regula a sus genes blanco solo cuando *Salmonella* crece en LB (Schechter *et al.*, 1999; Schechter and Lee, 2001; Ellermeier *et al.*, 2005). PhoP, SlyA y OmpR son reguladores que controlan la expresión de genes de virulencia en medio mínimo; de hecho, éstos inducen la expresión de SsrA/B, el regulador de los genes de SPI-2 (Walthers *et al.*, 2007, 2011; Lee *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2003, 2004; Bijlsma and Groisman, 2005; Linehan *et al.*, 2005; Okada *et al.*, 2007). Sin embargo, nuestros resultados indican que SsrA/B tampoco se requiere para la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* en medio MM-N. Recientemente, en otro proyecto de nuestro grupo se encontró que el gen *SL1872* está regulado en medio MM-N por PhoP (Banda M., datos no publicados).

Con base en lo anterior, la figura 22, panel B, muestra un modelo de la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* en medio mínimo.

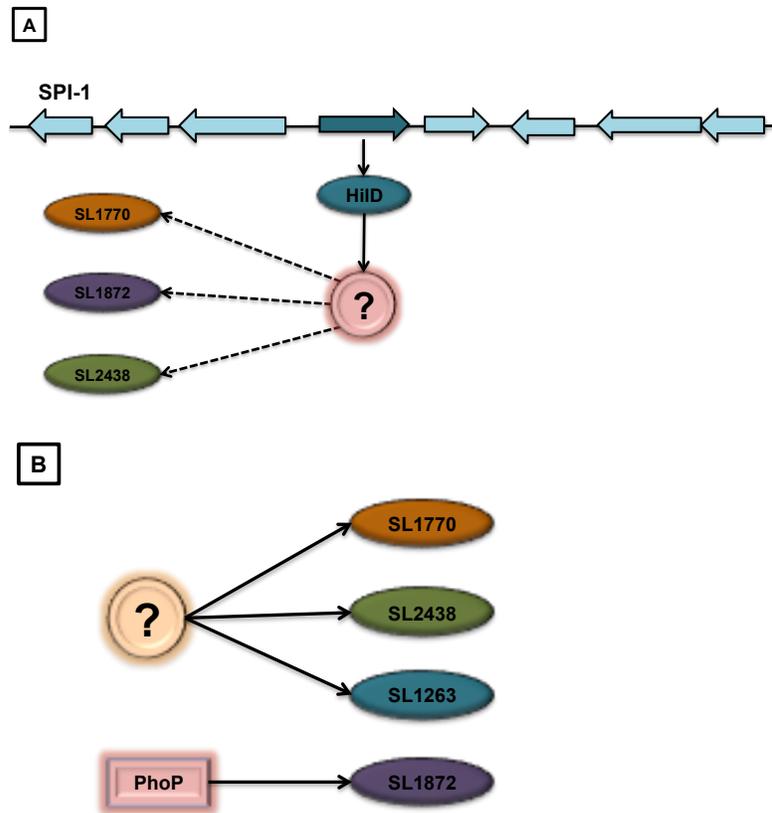


Figura 22. Modelo propuesto de regulación de la expresión de las proteínas SL1770, SL1872, SL2438 y SL1263. HiID regula en medio LB la expresión de las proteínas SL1770, SL1872 y SL2438, a través de un regulador intermediario (?) (A). Las proteínas SL1770, SL1872, SL2438 y SL1263 son reguladas en medio mínimo MM-N por un regulador transcripcional diferente a HiID y SsrA/B, para el caso de la proteína SL1872 su expresión depende de PhoP (B) (Banda M., datos no publicados).

En medio LB se ha visto que se induce la expresión de los genes de SPI-1, así como otros genes que tienen un papel importante en la invasión de *Salmonella* a las células epiteliales del intestino (Coombes *et al.*, 2005; Fàbrega and Vila, 2013). En medio mínimo se ha observado que se inducen los genes de SPI-2, así como otros genes con un papel importante para la replicación de *Salmonella* dentro de células epiteliales y macrófagos (Cordero-Alba and Ramos-Morales, 2014). Por lo tanto, se sugiere que el medio LB puede mimetizar al menos algunas de las condiciones que encuentra *Salmonella* en el intestino y el medio mínimo MM-N dentro de macrófagos (Lundberg *et al.*, 1999; Miao *et al.*, 2000; Bustamante *et al.* 2008; Kroger *et al.*, 2013; Deiwick *et al.*, 1999). Nuestros resultados indican que los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* se expresan en dos diferentes condiciones de crecimiento *in vitro*, en medio LB y MM-N, lo cual sugiere un papel importante tanto en la infección intestinal como en la sistémica. Para el caso del gen *SL1263*, el cual se expresa sólo en MM-N, su producto podría tener un papel en la infección de tipo sistémica. En un estudio previo, donde se analizó la expresión de los

---

genes de *S. Typhimurium* dentro de macrófagos, mediante transcriptomas, se observó que la expresión de los genes *SL1770* y *SL1872* se induce cuando la bacteria se encuentra dentro de macrófagos (Eriksson *et al.*, 2003) (Tabla 8 del apéndice). Sin embargo, el gen *SL2438* no muestra diferencia de expresión dentro de macrófagos comparada con el medio LB. Para el gen *SL1263* se observa una disminución en la expresión dentro de macrófagos comparada con el cultivo en medio LB. Esto apoya los resultados obtenidos para los genes *SL1770* y *SL1872* en medio MM-N. Para los genes *SL2438* y *SL1263* la discrepancia podría deberse a la diferencia en metodología, ya que en los resultados de transcriptoma, al ser un análisis global, puede haber errores en la cuantificación de algunos transcritos.

Como objetivo general, además de la regulación, se planteó analizar el papel en virulencia de los genes en estudio. En relación con esto, nuestros resultados muestran que la ausencia de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* no afecta la secreción de proteínas efectoras por el SST3 de SPI-1, lo cual indica que las proteínas *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* no forman parte del SST3-1. No obstante, encontramos que las proteínas *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* se requieren para una invasión eficiente de *S. Typhimurium* a células HeLa. Con los resultados obtenidos, no podemos definir la función de cada uno de los genes, pero el dominio transmembrana de la proteína *SL1770*, podría sugerir que posiblemente se exporta y se incorpora a la membrana externa o a la citoplásmica y forma un complejo con otras proteínas de membrana, el cuál podría ser necesario para el contacto de *Salmonella* con las células epiteliales del intestino. Las proteínas *SL1872* y *SL2438*, podrían actuar como efectoras que son translocadas del citoplasma de la bacteria al de las células del hospedero. A este respecto, hay varias proteínas efectoras codificadas fuera de SPI-1 y SPI-2, que se secretan por un solo SST3, ya sea por el SST3-1 o el SST3-2, pero existen otras, como las proteínas *SlrP*, *SspH1*, *SopD*, *SteB*, *GtgE*, *PipB2*, *SpvC*, *SpvD*, *SteA* y *SteE*, codificadas fuera de estas SPI's, las cuales se secretan por ambos SST3, tanto el de SPI-1 como el de SPI-2 (McGhie *et al.*, 2009; Fàbrega and Vila, 2013). Interesantemente, al igual que las proteínas que se analizaron en este estudio, las proteínas efectoras *SlrP* y *SspH1*, se expresan tanto en LB como en medio mínimo (Cordero-Alba and Ramos-Morales, 2014; Miao and Miller, 2000). Más aún, se ha demostrado que la expresión de *SlrP* se regula por *HilD* en LB y por *PhoP* en medio mínimo (Cordero-Alba and Ramos-Morales, 2014), tal como se ha observado para el gen *SL1872*. Por lo que las proteínas *SL1872* y *SL2438*, podrían ser proteínas efectoras secretadas tanto por SPI-1 como por SPI-2 y tener un papel importante en una infección intestinal, así como en una sistémica. Por el momento no se tiene una firma bien definida de las proteínas efectoras, por lo que

---

es complicado hacer una predicción de esta función. En lo que se está trabajando en otros proyectos de nuestro grupo es en determinar si las proteínas SL1770 y SL1872 se secretan y, si es así, si lo hacen por el SST3-1 o el SST3-2. En su caso, se determinará posteriormente si estas proteínas se translocan de *Salmonella* a células epiteliales o macrófagos. Esto definirá experimentalmente si las proteínas SL1872 y SL2438 son efectoras.

Los resultados de este estudio incrementan el conocimiento del regulón de HilD y de su implicación en la virulencia de *S. Typhimurium*. Asimismo, indican un sobreposicionamiento del regulón de HilD con el de otros reguladores, lo cual es evidente en diferentes condiciones de crecimiento; en este caso en LB, la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* es regulada por HilD, y en medio mínimo, su expresión es controlada por otro regulador. Además, revelan nuevas proteínas que pueden tener un papel importante durante diferentes fases de la infección de *Salmonella*, como puede ser la invasión y la replicación intracelular de sus células hospederas.

## **8. CONCLUSIONES.**

- ❖ Los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* son regulados positivamente por HilD de forma indirecta en medio LB
- ❖ La expresión de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* se induce en medio mínimo MM-N y es independiente de HilD y SsrA/B.
- ❖ Los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* no se requieren para la secreción de proteínas efectoras por el SST3 de SPI-1.
- ❖ Los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438* se requieren para una invasión eficiente de *S. Typhimurium* a células HeLa.

---

## 9. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.

- ❖ Encontrar el regulador por medio del cual HilD induce la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872* y *SL2438*.
- ❖ Identificar el regulador que induce la expresión de los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* en medio MM-N.
- ❖ Determinar si los genes *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263* son importantes para la replicación intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos, así como para la infección intestinal y sistémica de esta bacteria en ratones.
- ❖ Definir la función de las proteínas *SL1770*, *SL1872*, *SL2438* y *SL1263*.

## 10. APÉNDICE

### 10.1. Medios de cultivo empleados

#### Medio Luria-Bertani (LB).

Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	10 g

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

#### Medio mínimo N (MM-N).

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

Se esteriliza 20 minutos a 121°C con 15 lb de presión.

---

**Medio SOC.**

Bacto-triptona	2 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl 5 M	200 µL
KCl 1 M	250 µL
MgCl <sub>2</sub> 1 M	1 mL
MgSO <sub>4</sub> 1 M	1 mL
Glucosa	0.36 g

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

**Medio SOB.**

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	2.5 g
NaCl	0.25 g
KCl 1M	1.25 mL
Glucosa	0.36 g

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

**Caldo P22**

Medio 50x E (Esterilizado con CHCl <sub>3</sub> )	2 mL
Glucosa estéril al 20%	1 mL
Fago P22 HT int (Esterilizado con CHCl <sub>3</sub> )	0.1 mL

Mezclar en un matraz con 100 mL de medio LB estéril y almacenar a 4°C.

---

## 10.2. Reactivos empleados para Western blot.

### Buffer de transferencia

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

### PBS 10X

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
KCl	2 g
NaCl	80 g

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

### PBST

PBS 10X	100 mL
Tween-20	3 mL

### Solución bloqueadora

Leche en polvo sin grasa	1.5 g
PBST	cbp 30 mL

---

### **10.3. Reactivos empleados para el ensayo de invasión a células epiteliales.**

#### **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)[GIBCO (12100-046)]**

Agua destilada	800 mL
Bicarbonato de sodio	3.7 g

Se ajusta el pH a 7.2 y se esteriliza por filtración.

Se suplementa el medio con los siguientes reactivos:

MEM Non-essential aminoacids solution 100X (4°C)[GIBCO (11140-050)] 10 mL/L

MEM vitamin solution 100X (-20°C)GIBCO (11120-052)] 10 mL/L

Sodium pyruvate solution 100 mM (4°C)[SIGMA (S8636)] 10 mL/L

L-glutamine 200 mM (-20°C)[GIBCO (25030-081)] 10 mL/L

Fetal bovine serum-Inactivated (-20°C)[Byproductos (Lot. 13001)] 10 %

#### **PBS 1X**

Se diluyó el PBS 10X.

#### **Solución de solubilización**

Desoxicolato de sodio	100 mg
PBS 1X	cbp 50 mL

Tabla 8. Resultados del análisis de transcriptoma de la cepa de *S. Typhimurium* SL1344 WT, por medio de microarreglos, a partir de bacterias dentro de macrófagos. Se purificó RNA de las bacterias localizadas dentro de macrófagos, a las horas 4, 8 y 12 después de la infección. La cuantificación relativa de los genes se obtuvo comparando su expresión en las bacterias dentro de macrófagos con su expresión en las bacterias crecidas en LB. Así, un valor de 1 significa expresión igual en macrófagos y en LB, mientras que los valores <1 y >1, corresponden a una expresión menor y mayor en macrófagos, respectivamente. Fuente: Eriksson *et al.*, 2003.

<b>Macrófago tiempo postinfección</b>			
<b>Gen</b>	<b>Hora 4</b>	<b>Hora 8</b>	<b>Hora 12</b>
<b><i>invF</i></b>	<b>0.10</b>	<b>0.16</b>	<b>0.10</b>
<b><i>ssaG</i></b>	<b>4.06</b>	<b>1.84</b>	<b>5.89</b>
<b><i>SL1770</i></b>	<b>0.84</b>	<b>0.86</b>	<b>0.80</b>
<b><i>SL1872</i></b>	<b>6.20</b>	<b>5.05</b>	<b>4.36</b>
<b><i>SL2438</i></b>	<b>1.17</b>	<b>0.32</b>	<b>1.09</b>
<b><i>SL1263</i></b>	<b>0.11</b>	<b>0.10</b>	<b>0.16</b>

---

## 11. REFERENCIAS

Bispham J., Tripathi B.N., Watson P.R., and Wallis T.S. (2001). *Salmonella* pathogenicity island 2 influences both systemic salmonellosis and *Salmonella* induced enteritis in calves. *Infection and Immunity*. **69**: 367–377.

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

Brawn L.C., Hayward R.D., and Koronakis V. (2007). *Salmonella* SPI1 effector SipA persists after entry and cooperates with a SPI2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication. *Cell Host & Microbe*. **1**: 63-75.

Brown N.F., Vallance B.A., Coombes B.K., Valdez Y., Coburn B.A., and Finlay B.B. (2005). *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *Public Library of Science Pathogens*. **1**: e32.

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

Bustamante V.H., Martínez L.C., Santana F.J., Knodler L.A., Steele-Mortimer O., and Puente J.L. (2008). HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**: 14591-14596.

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. *Molecular Microbiology*. **30**: 175-188.

Coburn B., Grass I.G.A., and Finlay B.B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*. **85**: 112–118.

Collazo C.M., and Galán J.E. (1997). The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella* – a review . *Gene*. **192**: 51-59.

Coombes B.K., Coburn B.A., Potter A.A., Gomis S., Mirakhur K., Li Y., and Finlay B.B. (2005). Analysis of the contribution of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine ileal loop model and a murine model of infectious enterocolitis. *Infection and Immunity*. **73**: 7161-7169.

---

Cordero-Alba M., and Ramos-Morales F. (2014). Patterns of expression and Translocation of the ubiquitin ligase SlrP in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*. **196**: 3912-3922.

Cornelis G.R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology*. **4**: 811-825.

Datsenko K.A., and Wanner B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**: 6640-6645.

Deiwick J., Nikolaus T., Erdogan S., and Hensel M. (1999). Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Molecular Microbiology*. **31**: 1759–1773.

Ellermeier C.D., and Slauch J.M. (2003). RtsA and RtsB coordinately regulate expression of the invasion and flagellar genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*. **185**: 5096-5108.

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

Eriksson S., Lucchini S., Thompson A., Rhen M., and Hinton J. (2003). Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*. **47**: 103-118.

Fàbrega A., and Vila J. (2013). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*. **26**: 308-341.

Feng X., Oropeza R., and Kenney L.J. (2003). Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Molecular Microbiology*. **48**: 1131–1143.

Feng X., Walthers D., Oropeza R., and Kenney L.J. (2004). The response regulator SsrB activates transcription and binds to a region overlapping OmpR binding sites at *Salmonella* pathogenicity island 2. *Molecular Microbiology*. **54**: 823–835.

Figueira R., Watson K.G., Holden D.W., and Helaine S. (2013). Identification of *Salmonella* pathogenicity island-2 type III secretion system effectors involved in intramacrophage replication of *S. enterica* serovar Typhimurium: Implications for rational vaccine design. *MBio American Society for Microbiology*. **4**: e00065-13.

---

Folkesson A., Advani A., Sukupolvi S., Pfeifer J.D., Normark S., and Löfdahl S. (1999). Multiple insertions of fimbrial operons correlate with the evolution of *Salmonella* serovars responsible for human disease. *Molecular Microbiology*. **33**: 612-622.

Folkesson A., Löfdahl S., and Normark S. (2002). The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Research in Microbiology*. **153**: 537-545.

Foster J.W., and Hall H.K. (1991). Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. **173**: 5129–5135.

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.

Galán J.E., and Curtiss R. (1989). Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **86**: 6383–6387.

Groisman E.A., Sturmoski M.A., Solomon F.R., Lin R., and Ochman H. (1993). Molecular, functional, and evolutionary analysis of sequence specific to *Salmonella*. **90**: 1033-1037.

Haraga A., Ohlson M.B., and Miller S.I. (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nature Review Microbiology*. **6**: 53-66.

Hensel M., Hinsley A.P., Nikolaus T., Sawers G., and Berks B.C. (1999a). The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*. **32**: 275-287.

Hensel M., Nikolaus T., and Egelseer C. (1999b). Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Molecular Microbiology*. **31**: 489-498.

Hensel M., Shea J.E., Raupach B., Monack D., Falkow S., Gleeson C., Kubo T., and Holden D.W. (1997). Functional analysis of *ssaJ* and the *ssaK/U* operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Molecular Microbiology*. **24**: 155–167.

---

Hensel M. (2004). Review. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. International Journal of Medical Microbiology. **294**: 95-102.

Hoiseth S.K., and Stocker B.A.D. (1981). Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. **291**: 238-239.

Ibarra J.A., Knodler L.A., Sturdevant D.E., Virtaneva K., Carmody A.B., Fischer E.R., Porcella S.F., and Steele-Mortimer O. (2010). Induction of *Salmonella* pathogenicity island 1 under different growth conditions can affect *Salmonella*-host cell interactions *in vitro*. Microbiology. **156**: 1120-1133.

Jones B.D., Ghori N., and Falkow S. (1994). *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. Journal of Experimental Medicine. **180**: 15-23.

Kroger C., Colgan A., Srikumar S., Handler K., Sivasankaran S.K., Hammarlöf D.L., Canals R., Grissom J.E., Conway T., Hokamp K., and Hinton J.C. (2013). An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Cell Host Microbe. **14**: 683-695.

Kuhle V., and Hensel M. (2004). Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. Cellular and Molecular Life Sciences. **61**: 2812-2826.

Laughlin R.C., Knodler L.A., Barhoumi R., Payne H.R., Wu J., Gomez G., Pugh R., Lawhon S.D., Bäumler A.J., Steele-Mortimer O., and Adams L.G. (2014). Spatial segregation of virulence gene expression during acute enteric infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. MBio American Society for Microbiology. **5**: e00946-13.

Lee A.K., Detweiler C.S., and Falkow S. (2000). OmpR regulates the two component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. Journal of Bacteriology. **182**: 771-781.

Linehan S.A., Rytönen A., Yu X.J., Liu M., and Holden D.W. (2005). SlyA regulates function of *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) and expression of SPI-2-associated genes. Infection and Immunity. **73**: 4354-4362.

Lostroh C.P., and Lee C.A. (2001). The *Salmonella* pathogenicity island -1 type III secretion system. Microbes and infection. **3**: 1281-1291.

Lundberg U., Vinatzer U., Berdnik D., von Gabain A., and Baccarini M. (1999). Growth phase-regulated induction of *Salmonella* induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. Journal of Bacteriology. **181**: 3433-3437.

---

Maddocks S.E., and Oyston P.C. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*. **154**: 3609-3623.

Main-Hester K.L., Colpitts K.M., Thomas G.A., Fang F.C., and Libby S.J. (2008). Coordinate regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*. **76**: 1024–1035.

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

Martínez L.C., Banda M.M., Fernández-Mora M., Santana F.J., and Bustamante H. V. (2014). HilD induces expression of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 genes by displacing the global negative regulator H-NS from *ssrAB*. *Journal of Bacteriology*. **196**: 3746-3755.

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

McGhie E.J., Brawn L.C., Hume P.J., Humphreys D., and Koronakis V. (2009). *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Current Opinion in Microbiology*. **12**: 117–124.

Miao E.A., and Miller S.I. (2000). A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**: 7539–7544.

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

Moest T.P., and Méresse S. (2013). *Salmonella* T3SSs: successful mission of the secretion agents. *Current Opinion in Microbiology*. **16**: 38-44.

Mulder D.T., Cooper C.A., and Coombes B.K. (2012). Type VI Secretion system-associated gene clusters contribute to pathogenesis of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*. **80**: 1996-2007.

---

Nikolaus T., Deiwick J., Rapp C., Freeman J.A., Schröder W., Miller S.I., and Hensel M. (2001). SseBCD proteins are secreted by type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 and function as a translocon. *Journal of Bacteriology*. **183**: 6036-6045.

Ochman H., Soncini F.C., Solomon F., and Groisman E. A. (1996). Identification of the pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**: 7800-7804.

Okada N., Oi Y., Takeda-Shitaka M., Kanou K., Umeyama H., Haneda T., Miki T., Hosoya S., and Danbara H. (2007). Identification of amino acid residues of *Salmonella* SlyA that are critical for transcriptional regulation. *Microbiology*. **153**: 548–560.

Olekhovich I.N., and Kadner R.J. (2006). Crucial roles of both flanking sequences in silencing of the *hilA* promoter in *Salmonella enterica*. *Journal of Molecular Biology*. **357**: 373-386.

Parry C.M, Hien T.T, Dougan G., White N.J., and Farrar J.J. (2002). Typhoid fever. *New England Journal of Medicine*. **347**: 1770–1782.

Petrone B.L., Stringer A.M., and Wade J.T. (2013). Identification of HilD-regulated genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*. **196**: 1094-1101.

Poh J., Odendall C., Spanos A., Boyle C., Liu M., Freemont P., and Holden D.W. (2008). SteC is a *Salmonella* kinase required for SPI-2-dependent F-actin remodeling. *Cellular Microbiology*. **10**: 20-30.

Porwollik S., and McClelland M. (2003). Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes and Infection*. **5**: 977-989.

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

Rajashekar R., Liebl D., Seitz A., and Hensel M. (2008). Dynamic remodeling of the endosomal system during formation of *Salmonella*-Induced Filaments by intracellular *Salmonella enterica*. *Traffic*. **9**: 2100-2116.

Rakeman J.L., Bonifield H.R., and Miller S.I. (1999). A HilA- independent pathway to *Salmonella typhimurium* invasion gene transcription. *Journal of Bacteriology*. **181**: 3096-3104.

---

Ramos-Morales F. (2012). Impact of *Salmonella enterica* Type III secretion system effectors on the eukaryotic host cell. International Scholarly Research Network. **2012**: 36.

Saini S., and Rao C.V. (2010). SprB is the molecular link between *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI1) and SPI4. Journal of Bacteriology. **192**: 2459-2462.

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

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

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

Steele-Mortimer O., Méresse S., Toh B.H., Gorvel J.P., and Finlay B.B. (1999). Biogenesis of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. Cellular Microbiology. **1**: 33-49.

Thijs I.M.V, Keersmaecker S.C.J., Fadda A., Engelen K., Zhao H., McClelland M., Marchal K., and Vanderleyden J. (2007). Delineation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium HilA regulon through genome-wide location and transcript analysis. Journal of Bacteriology. **189**: 4587-4596.

Tropel D., and van der Meer J.R. (2004). Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. Microbiology and Molecular Biology Reviews. **68**: 474–500.

Uchiya K., Barbieri M.A., Funato K., Shah A.H., Stahl P.D., and Groisman E.A. (1999). A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. The European Molecular Biology Organization Journal. **8**: 3924–3933.

Uzzau S., Figueroa-Bossi N., Rubino S., and Bossi L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **98**: 15264-15269.

Walthers D., Carroll R.K., Navarre W.W., Libby S.J., Fang F.C., and Kenney, L.J. (2007). The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. Molecular Microbiology. **65**: 477–493.

---

Walthers D., Li Y., Liu Y., Anand G., Yan J., and Kenney L.J. (2011). *Salmonella* enterica response regulator SsrB relieves H-NS silencing by displacing H-NS bound in polymerization mode and directly activates transcription. *Journal of Biological Chemistry*. **286**: 1895–1902.