



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Inducción de la expresión del operón *ssrAB* de
Salmonella por la acción cooperativa de los reguladores
SlyA, HilD y OmpR.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

JOSÉ CRISPÍN ZAVALA ALVARADO

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. MARIO SOBERÓN CHÁVEZ
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Ciudad de México. Agosto, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo.

Dr. Mario Soberón Chávez.

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Presidente	Dra. Isabel Gómez Gómez
Secretario	Dr. Daniel Genaro Segura González
Vocal	Dra. María de Lourdes Girard Cuesy
Vocal	Dr. José Adelfo Escalante Lozada
Vocal	Dr. Armando Hernández Mendoza

Durante el desarrollo de esta tesis recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 599442), así como apoyo de proyectos PAPIIT-UNAM (IN203415) y de CONCACYT-CB (179071) para la realización de mi trabajo de investigación.

Dedico esta tesis a las personas que toda la vida han estado apoyándome para lograr mis sueños, aconsejándome para lograr discernir entre lo falso y verdadero, guiándome en la vida para no perderme y porque gracias a ustedes hoy pude lograr una meta más. Por esto y mucho más, esta tesis se la dedico a ustedes:

Mis padres, Leticia y Crispín.

Mi hermano, Adrián.

AGRADECIMIENTOS:

A Frania Jaqueline por su inmenso apoyo, por siempre proporcionarme una hermosa sonrisa ante cada evento, ya sea bueno o malo y por sus invaluable consejos.

A mis amigos, que siempre han estado apoyándome a lo largo de todo este tiempo de conocernos. Sin su amistad este trayecto no hubiera sido tan ameno como lo fue.

Al operón Bustamante, por su ayuda y consejos a lo largo de la realización de este proyecto; sin ustedes no hubiera podido lograrlo.

Al Dr. Víctor Bustamante, por haberme brindado la oportunidad de realizar este proyecto bajo su asesoría, por siempre creer en mí, por estar al pendiente de este proyecto y sobre todo por compartir sus conocimientos científicos conmigo. Siempre estaré agradecido por su apoyo incondicional y confianza en mí.

Al Dr. Puente y Dr. Calva, por su apoyo, observaciones y consejos hacía el proyecto u otros ámbitos.

A Mario y la Sra. Rebeca, ya que sin ustedes no habría tesis ni artículos que publicar, son parte fundamental del laboratorio.

A la Dra. Guadalupe Espín y al Dr. Mario Soberón, por formar parte de mi comité tutorial, por sus consejos y observaciones, las cuales fueron fundamentales para este proyecto.

A los miembros de mi jurado de tesis, la Dra. Isabel Gómez, la Dra. María de Lourdes Girard, el Dr. Adelfo Escalante, el Dr. Armando Hernández y el Dr. Daniel Segura, por sus comentarios y observaciones hacia mi trabajo.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), por el apoyo para la asistencia al IV Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias.

LISTA DE ABREVIATURAS:

A	Adenina
ATP	Adenosín trifosfato
C	Citosina
°C	Grados centígrados
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
Cl ⁻	Ión cloruro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EMSA	Ensayo de retardamiento en gel de la movilidad electroforética
G	Guanina
h	Hora
Ig	Inmunoglobulina
kb	Kilobase
kV	Kilovoltios
LB	Luria-Bertani
M	Molar
Mg	Miligramo
Mg ²⁺	Ión magnesio
min	Minuto
μl	Microlitro
ml	Mililitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
MM-N	Medio mínimo N
MQ	Milli-Q
ms	Milisegundo
nm	nanómetro

nM	Nanomolar
ORF	Marco de lectura abierta
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
PAI	Isla de patogenicidad
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
RNA pol	RNA polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SCV	Vacuolas que contienen a Salmonella
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SPI	Isla de patogenicidad de Salmonella
SST3	Sistema de secreción tipo tres
T	Timina
UV	Ultravioleta
V	Voltios
WT	Cepa silvestre

ÍNDICE GENERAL:

RESUMEN.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
A. El género <i>Salmonella</i> y su importancia.....	12
B. Patogénesis.....	13
C. Islas de Patogenicidad de <i>Salmonella</i>	15
D. SPI-1.....	18
E. SPI-2.....	19
F. Operón <i>ssrAB</i>	22
G. Regulación de la expresión del operón <i>ssrAB</i> por H-NS, HilD, OmpR y SlyA.....	24
G.1. H-NS.....	24
G.2. HilD.....	25
G.3. OmpR/EnvZ.....	26
G.4. SlyA.....	26
II. ANTECEDENTES.....	28
III . HIPÓTESIS.....	31
IV. OBJETIVOS.....	31
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
A. Generación de las cepas <i>S. Typhimurium</i> SL1344 $\Delta hilD \Delta slyA$, $\Delta slyA::Km$ $ssrA::3xFLAG$ y $\Delta hilD \Delta slyA::Km$ $ssrA::3xFLAG$	36
B. Generación de las cepas <i>S. Typhimurium</i> SL1344 $\Delta slyA::$, $\Delta hilD \Delta slyA::$ y $\Delta slyA:: ssrA::3xFLAG$	37
C. Generación del plásmido que contiene la fusión transcripcional <i>slyA-cat</i>	38
D. Purificación de plásmidos.....	40
E. Preparación de células electrocompetentes.....	40
F. Electroporación.....	41
G. Preparación de los cultivos bacterianos para cuantificación de la expresión del gen <i>ssrAB</i> de la isla SPI-2.....	41

G.1. Medio LB.....	42
G.2. MM-N.....	42
H. Cuantificación de la actividad específica de CAT (<u>C</u> loramfenicol <u>A</u> cetil <u>T</u> ransferasa).....	42
I. Análisis Estadístico.....	43
J. Inmunodetección de la proteína SsrA-FLAG mediante “Western blot”.....	44
K. Expresión y purificación de las proteínas His-HA-SlyA y H-NS-FH.....	45
L. 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.....	46
VI. RESULTADOS.....	47
VI.1. SlyA regula positivamente la expresión del operón <i>ssrAB</i> en medio LB.....	47
VI.2. SlyA actúa como un anti-represor de H-NS en la expresión del operón <i>ssrAB</i>	49
VI.3. SlyA desplaza a H-NS de la región reguladora de <i>ssrAB</i>	52
VI.4. SlyA y HilD contrarrestan la represión que ejerce H-NS en el operón <i>ssrAB</i>	56
VI.4.1 La expresión del operón <i>ssrAB</i> requiere de la acción conjunta de SlyA y HilD que actúan como anti-represores de H-NS y de OmpR, el cual actúa como un activador clásico	59
VI.5. Se requiere del regulador SlyA para la expresión del operón <i>ssrAB</i> en MM-N y actúa como anti-represor de H-NS.....	62
VI.6. Circuito de regulación positiva formado por HilD y SlyA.....	66
VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	70
VIII. PERSPECTIVAS.....	77
IX. APÉNDICE.....	78
X. BIBLIOGRAFÍA.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Progresividad de la infección ocasionada por <i>Salmonella</i>	14
Figura 2. Organización genética de las principales islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i> y esquema de un sistema de secreción tipo 3 (SST3).....	17
Figura 3. Proteínas efectoras translocadas por el T3SS de SPI-2 y respuesta en la célula epitelial.....	21
Figura 4. Regulación de la expresión de los genes de SPI-2 en dos diferentes condiciones de crecimiento.....	23
Figura 5. Modelo de los mecanismos de represión que ejerce H-NS sobre sus genes blanco.....	24
Figura 6. Estructura del dímero de la proteína SlyA.....	27
Figura 7. Regulación del operón <i>ssrAB</i> por HilD, OmpR y SlyA.....	29
Figura 8. Modelo actual de regulación de la expresión de <i>ssrAB</i> en LB.....	30
Figura 9. Esquema de la fusión transcripcional <i>slyA-cat</i>	39
Figura 10. SlyA regula positivamente la expresión del operón <i>ssrAB</i> en medio LB.....	48
Figura 11. Se requiere de SlyA para la expresión del operón <i>ssrAB</i> sólo en presencia de la actividad de H-NS.....	50
Figura 12. SlyA actúa como un anti-represor de H-NS en la expresión del operón <i>ssrAB</i>	51
Figura 13. Purificación y caracterización de la proteína His-HA-SlyA.....	53
Figura 14. La proteína His-HA-SlyA se une de manera específica a las regiones reguladoras de <i>ssrAB</i> y <i>ugtL</i>	54
Figura 15. SlyA desplaza a H-NS de la región regulatoria del operón <i>ssrAB</i>	56
Figura 16. SlyA y HilD antagonizan la represión ejercida por H-NS del operón <i>ssrAB</i>	57
Figura 17. SsrA-FLAG se detecta en la cepa $\Delta hilD \Delta slyA$ al momento de inhibir al represor H-NS.....	58
Figura 18. Regulación del operón <i>ssrAB</i> por HilD, SlyA y OmpR.....	60

Figura 19. OmpR se requiere para la expresión de *ssrAB* aún en la ausencia de la actividad de H-NS.....61

Figura 20. Se requiere de SlyA para la expresión del operón *ssrAB* en MM-N.....63

Figura 21. SlyA actúa como un anti-represor de H-NS para la expresión del operón *ssrAB* en MM-N.....64

Figura 22. SlyA actúa como un anti-represor de H-NS para la expresión de *SsrA* en MM-N.....65

Figura 23. SlyA y HilD se regulan positivamente el uno al otro.....67

Figura 24. SlyA no interacciona con la región regulatoria de *hilD* y HilD no interacciona con la región regulatoria de *slyA*.....68

Figura 25. Modelo de regulación de la expresión de *ssrAB* por H-NS, HilD, SlyA y OmpR.....73

Figura 26. Circuito de regulación formado por SlyA y HilD que controla la expresión de *ssrAB* en medio LB.....75

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.....32

Tabla 2. Plásmidos utilizadas en este trabajo.....33

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.....35

Tabla 4. Antibióticos y dosis empleados en este trabajo.....36

Tabla 5. Combinaciones y cantidades utilizadas en los experimentos de transducción para la generación de las cepas mutantes.....36

RESUMEN

Los principales genes que *Salmonella enterica* requiere para su virulencia se encuentran codificados en dos regiones de su genoma denominadas islas de patogenicidad 1 y 2 (SPI-1 y SPI-2) de *Salmonella*. Los genes de SPI-1 son necesarios para que *Salmonella* pueda invadir a las células epiteliales, mientras que los genes de SPI-2 son necesarios principalmente para su replicación y sobrevivencia dentro de macrófagos, aunque también se requieren para inducir una respuesta inflamatoria en el intestino. Consistente con su función, los genes de SPI-2 se expresan intracelularmente en macrófagos y en la submucosa intestinal. *In vitro*, los genes de SPI-2 se expresan cuando *Salmonella* se crece tanto en medios mínimos, como en una fase estacionaria tardía en medios ricos, como LB. La expresión de los genes de SPI-2 en LB está mediada por HilD, el cual está codificado en SPI-1 y pertenece a la familia de reguladores transcripcionales de AraC/XylS, y el regulador de respuesta OmpR del sistema de dos componentes EnvZ/OmpR. En contraste, la expresión de los genes de SPI-2 en medios mínimos no requiere de HilD pero sí de OmpR. Estudios previos han mostrado que para la expresión de los genes de SPI-2 en medios mínimos se requiere también de SlyA, el cual pertenece a la familia de reguladores transcripcionales MarR/SlyA. HilD induce la expresión del operón *ssrAB* contrarrestando la represión que ejerce H-NS sobre el promotor de este mismo, mientras que OmpR actúa como un activador clásico en *ssrAB* y se desconocía cómo SlyA actúa en este operón. En este estudio se muestra que además de HilD y OmpR se requiere también de SlyA para la expresión del operón *ssrAB* en LB en una fase estacionaria tardía de crecimiento, lo cual revela un interesante mecanismo cooperativo entre SlyA, HilD y OmpR para inducir la expresión del operón *ssrAB*. Nuestros resultados indican que SlyA contrarresta la represión que ejerce H-NS sobre *ssrAB* en ambos medios de cultivo, LB y MM-N. Esto sugiere que cuando *Salmonella* se crece en LB, SlyA y HilD actúan como anti-represores de H-NS, mientras que OmpR actúa como un activador clásico. Sorprendentemente, en este trabajo también determinamos que SlyA y HilD se regulan positivamente el uno al otro, formando así un circuito que controla la expresión de los genes de SPI-2. En conclusión, este estudio revela mecanismos novedosos que son parte importante de la compleja red de regulación que controla la expresión de los genes de virulencia de *Salmonella*.

I. INTRODUCCIÓN.

A.- El género *Salmonella* y su importancia.

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, la cual agrupa a bacterias Gram-negativas, anaerobias facultativas y patógenas tanto de humanos como de animales. Este género a su vez se divide en dos especies: *bongori*, la cual agrupa bacterias que infectan con mayor incidencia a vertebrados de sangre fría, y *enterica* que se divide en seis subespecies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*). Dentro de *S. enterica* subespecie *enterica* se han descrito aproximadamente 2500 serovares, esto con base en el reconocimiento antigénico del lipopolisacárido O y al antígeno H del flagelo (Fàbrega *et al.*, 2013).

S. enterica agrupa bacterias que pueden ocasionar gastroenteritis, provocando diarrea, o infecciones sistémicas, causando fiebre tifoidea (Raffatellu *et al.*, 2006); posee serovares que son patógenos obligados de un solo hospedero, como por ejemplo *S. Typhi*, el cual es un patógeno de humanos y principal causante de la fiebre tifoidea. Sin embargo, hay serovares que tiene un rango amplio de hospederos, como *S. Typhimurium*, el cual en animales puede ocasionar tanto la gastroenteritis como la infección sistémica, dependiendo de su hospedero (Uzzau *et al.*, 2000). Debido a esto, *S. Typhimurium* se emplea como modelo en infecciones a ratones, bovinos o a cultivos de células epiteliales para el estudio de los mecanismos moleculares de patogenicidad de *S. enterica* (Fàbrega *et al.*, 2013; Haraga *et al.*, 2008).

La infección por *Salmonella* es la principal causa de diarrea en países en vía de desarrollo, se adquiere por medio del consumo de alimentos y/o agua contaminados. La gastroenteritis (salmonelosis) es generado por serovares de *Salmonella* no tifoideos, siendo los de mayor incidencia *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, los cuales son transmitidos a humanos principalmente mediante el consumo de productos de origen animal o vegetal contaminados (Callaway, *et al.*, 2008). La OMS ha estimado que hay al año 93,757,000 casos de gastroenteritis generado por serovares de *S. enterica* no tifoideos, como *S. Typhimurium*, generando 155,000 muertes al año en todo el mundo, de éstos, aproximadamente

89,069,000 casos son por el consumo de alimentos contaminados (Callaway *et al.*, 2008; Majowicz *et al.*, 2010). A diferencia de la gastroenteritis, la fiebre tifoidea es ocasionada por serovares de *Salmonella* tifoideos, como por ejemplo *S. Typhi*. La OMS estima que anualmente hay 16 millones de casos de fiebre tifoidea, generando más de 600,000 muertes anuales (Raffatellu *et al.*, 2005; Merican *et al.*, 1997).

B.- Patogénesis.

Al momento de consumir agua y/o alimentos contaminados hay alta probabilidad de ser infectados por *Salmonella*. Sin embargo, contamos con varias barreras biológicas, para las cuales la bacteria se ha adaptado de tal manera que puede contrarrestarlas.

El primer obstáculo al que se enfrenta *Salmonella* es el pH ácido del estómago, para lo cual la bacteria cuenta con una respuesta adaptativa de tolerancia ácida, promoviendo su supervivencia en el estómago (Haraga *et al.*, 2008). Cuando *Salmonella* llega al intestino delgado es capaz de atravesar la capa de la mucosa intestinal, evadiendo la acción de enzimas digestivas, sales biliares, IgA, péptidos antimicrobianos y otros factores de respuesta del sistema inmune innato, para poder llegar al epitelio subyacente (Figura 1) (Prouty *et al.*, 2004). Posteriormente, *Salmonella* se adhiere a la superficie apical de las células epiteliales usando varias adhesinas fimbriales. *Salmonella* puede invadir a los enterocitos; sin embargo, otro mecanismo por el cual puede entrar la bacteria es por las células M (con micropliegues), las cuales son células epiteliales especializadas en el transporte de antígenos por pinocitosis hacia las células linfoides de las Placas de Peyer (Jones *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2014).

Posteriormente a que la bacteria se haya adherido a las células epiteliales, se induce la re-organización del citoesqueleto, formando las estructuras llamadas “membrane ruffles”, lo cual facilita la invasión de *Salmonella*, ocasionando la infección intestinal (Haraga *et al.*, 2008; Miroid *et al.*, 2001).

Simultáneamente se induce una respuesta secretora en el lumen intestinal que inicia con el reclutamiento y translocación de fagocitos desde el espacio

submucoide al lumen intestinal, generando así una respuesta inflamatoria. Este proceso está asociado a la producción de citocinas pro-inflamatorias, como la IL-8 que estimula la trans migración de leucocitos polimorfonucleares (PMN), y el factor TNF- α , el cual induce que haya una acumulación de fluido en el lumen intestinal (Fàbrega *et al.*, 2013; Haraga *et al.*, 2008). La inducción de la respuesta inflamatoria en el lumen intestinal es una estrategia que provoca *Salmonella* para eliminar gran parte de la microbiota intestinal, lo cual favorece su colonización en el intestino delgado (Ahmer *et al.*, 2011; Stecher *et al.*, 2007)

Eventualmente la bacteria llega a la submucosa intestinal, en dónde las que pertenecen a los serovares de *Salmonella* que ocasionan infección sistémica, son fagocitadas por células del sistema inmune innato, particularmente por macrófagos. Intracelularmente se localiza en una estructura especializada del fagosoma llamada “*Salmonella* containing vacuole” (SCV), en donde podrá evitar los mecanismos de eliminación de bacterias de los macrófagos. Esta adaptación promueve su sobrevivencia y su subsecuente diseminación por el sistema linfático, generando la infección sistémica (Figura 1) (Geddes *et al.*, 2005; Fàbrega *et al.*, 2013).

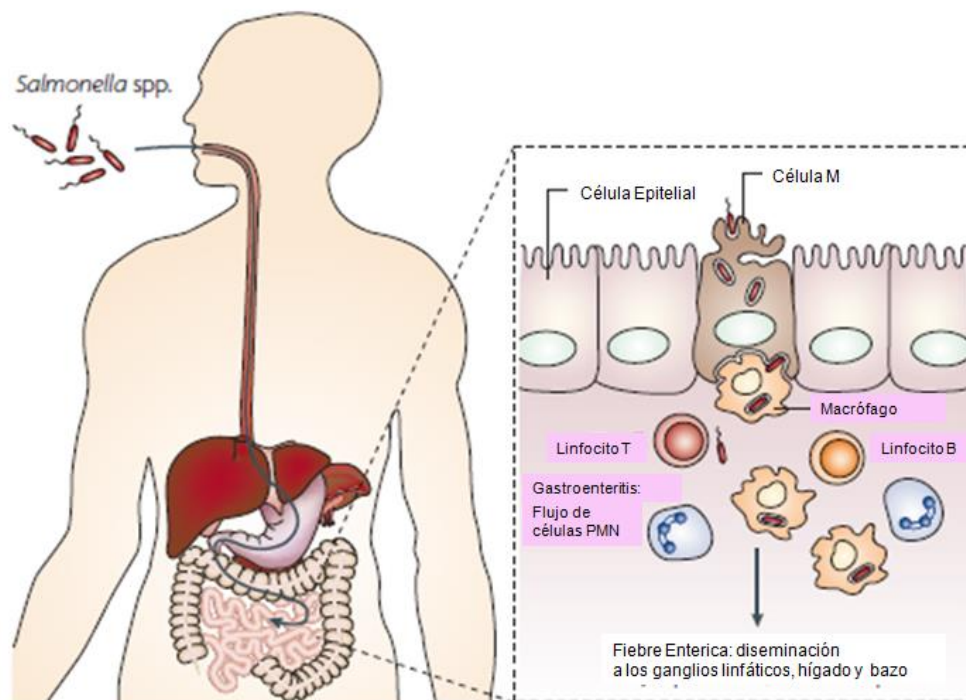


Fig. 1. Progresividad de la infección ocasionada por *Salmonella*. Una vez ingerida oralmente, *Salmonella* puede sobrevivir al pH ácido del estómago, pasando hacia el lumen intestinal. La bacteria invade a las células epiteliales generando la infección intestinal, simultáneamente se induce una respuesta inflamatoria intestinal. Una vez que *Salmonella* atraviesa el epitelio, la bacteria es fagocitada por los macrófagos u otras células fagocíticas del sistema inmune, promoviendo su diseminación, lo cual ocasiona la infección sistémica. PMN indica leucocitos polimorfonucleares (Adaptado de Haraga *et al.*, 2008).

C.- Islas de patogenicidad de *Salmonella*.

La mayoría de los genes de virulencia de *Salmonella* han sido adquiridos mediante transferencia horizontal y se encuentran agrupados en regiones de su genoma conocidas como islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs por *Salmonella Pathogenicity Islands*) (Schmidt *et al.*, 2004). Las primeras islas de patogenicidad (PAIs) se descubrieron en *Escherichia coli*; sin embargo, posteriormente se determinó que también están presentes en otras bacterias patógenas Gram-positivas y Gram-negativas. Entre las características que se encuentran en estas regiones genómicas son las siguientes:

- Están presentes en el genoma de organismos patógenos, y ausentes en el de organismos no patógenos.
- La mayoría de las PAIs abarcan una región de DNA de al menos 10-20 kb, aunque pueden llegar a ser de 200 kb. Cuando las regiones de DNA que codifican para factores de virulencia son menores a 10 kb, se les conoce como isletas de patogenicidad.
- Los PAIs son regiones de DNA que frecuentemente difieren en su contenido de G+C respecto al resto del genoma de la bacteria, lo que indica la obtención de estas regiones mediante eventos de transferencia horizontal.
- Estas islas generalmente se encuentran flanqueadas por pequeñas secuencias directas repetidas (DR), las que se generan después de la integración de la isla a regiones específicas del genoma bacteriano mediante eventos de recombinación sitio-específica.

- Están frecuentemente asociadas a genes de RNA de transferencia (RNA_t), ya que los loci de los RNA_t actúan como sitios de integración de DNA foráneo.
- Contienen genes que codifican para elementos de movilidad, como son integrasas, transposasas o secuencias de inserción (IS), lo que posiblemente indica su origen a partir de un bacteriófago o plásmido conjugativo (Baños *et al.*, 2009; Hacker *et al.*, 1997; Miold *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2004).

Hasta ahora se han descrito 22 diferentes SPIs, de las cuales las mejor caracterizadas han sido SPI-1 y SPI-2. Estas islas de patogenicidad son esenciales para la virulencia de *Salmonella enterica*. Ambas codifican para un sistema de secreción tipo 3 (SST3), para proteínas efectoras que se translocan por el SST3 a la célula eucarionte y para chaperonas de estas proteínas efectoras, así como para reguladores transcripcionales necesarios para la expresión de los genes de cada isla (Figura 2A). El SST3 es un complejo proteínico que forma una jeringa molecular a través de la cual la bacteria “inyecta” proteínas efectoras al interior de las células del hospedero. Evolutivamente, se propone que deriva del sistema flagelar bacteriano y está presente en muchas bacterias Gram-negativas (Figura 2B). (Fàbrega *et al.*, 2013; Haraga *et al.*, 2008; T P Moest *et al.*, 2013).

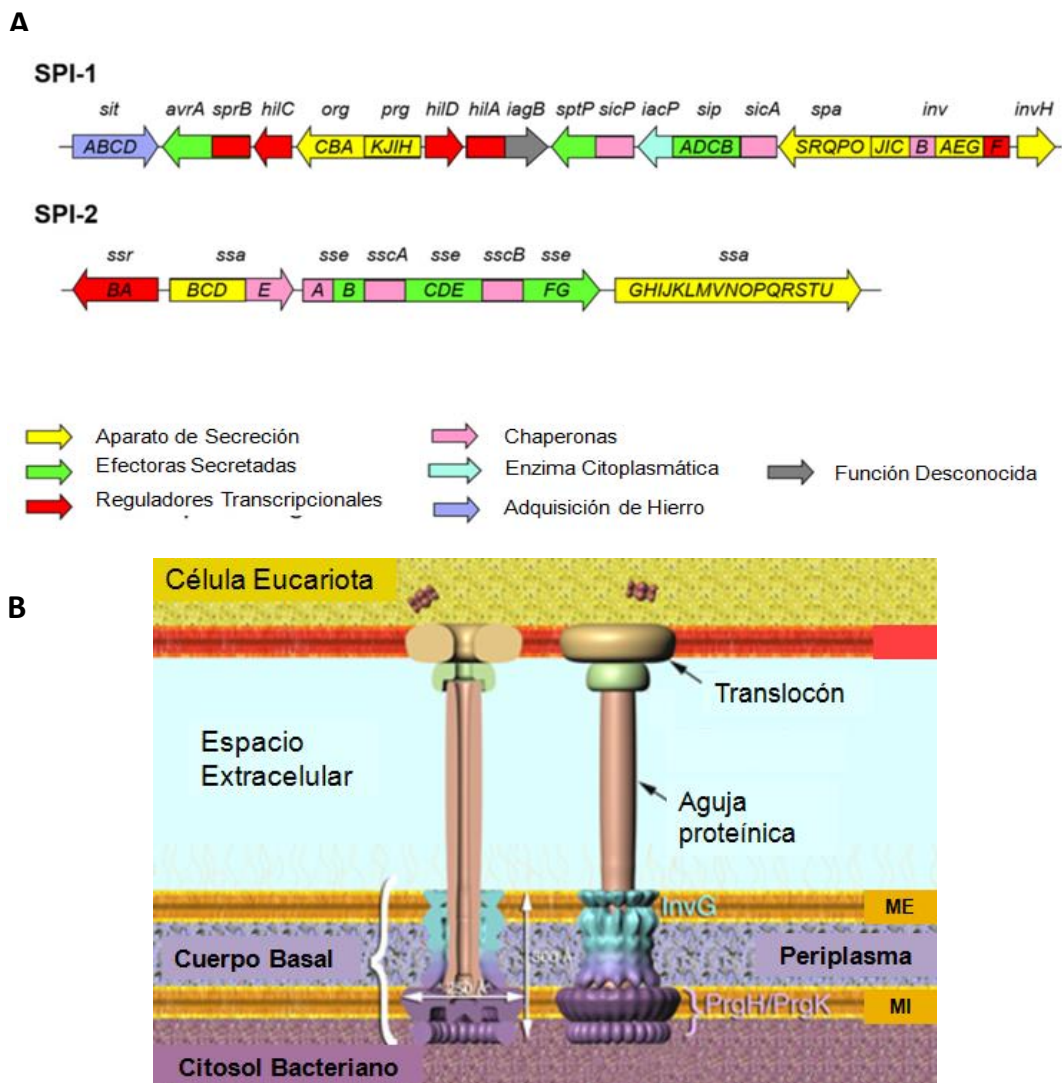


Fig 2. Organización genética de las principales islas de patogenicidad de *Salmonella* (A) y esquema de un sistema de secreción tipo 3 (SST3) (B). Se muestra el orden de los genes de las principales islas de patogenicidad y lo que codifica cada gen (Adaptado de Fàbrega & Vila, 2013). El SST3 está compuesto por un cuerpo basal que consiste de un anillo interno que se localiza en la membrana interna (MI), un cuello que pasa por el periplasma y un anillo externo que se localiza en la membrana externa (ME). Unido a este cuerpo basal está la estructura proteínica en forma de aguja, la cual termina en el translocón que se inserta en la membrana de la célula eucariota (Adaptado de Stebbins & Galán, 2003).

D.- SPI-1.

SPI-1 es una isla de patogenicidad que abarca una región cromosómica de 40 kb y se localiza en todos los miembros del género *Salmonella*. La expresión de esta isla genómica es necesaria para que la bacteria pueda invadir las células epiteliales, mediante la translocación de una serie de proteínas efectoras por un sistema de secreción tipo 3 codificado en esta isla de patogenicidad (SST3-1), las cuales inducen el re-arreglo de las proteínas del citoesqueleto de las células epiteliales, lo que permite la internalización de *Salmonella* (Hensel *et al.*, 2004). Esta isla contiene 39 genes, los cuales codifican para el SST3-1, proteínas efectoras, chaperonas y para varios reguladores transcripcionales. Como se puede observar en la figura 2A, los operones *prg/org* e *inv/spa* codifican para el complejo aguja del SST3-1, mientras que los operones *sic/sip* codifican para las proteínas efectoras (SptP, SipA, SipB y AvrA) y para proteínas translocadoras (SipB, SipC y SipD) (Ehrbar *et al.*, 2003; Fàbrega *et al.*, 2013; Hansen-Wester *et al.*, 2001; Lavigne *et al.*, 2008).

Una vez que *Salmonella* se adhiere a la superficie apical de la célula epitelial, se induce la translocación de una serie de proteínas efectoras por el SST3-1, dentro de las cuales están SipA, SipC, SopE, SopE2, SopB y SptP, hacia la célula hospedera. (Dieye *et al.*, 2009; Ehrbar *et al.*, 2003; Fàbrega *et al.*, 2013). Los efectores SopE y SopE2 promueven la activación de las Rho-GTPasas Rac1 y Cdc42 modificando el ensamblaje de la actina del citoesqueleto y junto con el efector SopB, el cual contribuye al remodelamiento de la actina, promueven la re-organización del citoesqueleto, alterando el borde de la célula epitelial. En cooperación con los efectores SipA y SipC, que interaccionan con los filamentos de actina, se induce la formación de estructuras en la membrana denominadas “membrane ruffles”, favoreciendo la invasión de *Salmonella* a las células epiteliales, produciéndose así la infección intestinal (Ehrbar *et al.*, 2003; Haraga *et al.*, 2008; Miold *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2004; Srikanth *et al.*, 2011).

La activación de la Rho-GTPasa Cdc42 mediada por las proteínas efectoras SopE, SopE2 y SopB estimula la inducción de varias vías promovidas por la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Esto da como resultado la acción de

factores transcripcionales, como la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear κ B (NF- κ B), lo cuales están directamente involucrados en la producción de citocinas pro-inflamatorias, como la interleucina 8 (IL-8) (Abrahams *et al.*, 2006; Haraga *et al.*, 2008; Srikanth *et al.*, 2011).

La expresión de los genes de SPI-1 se encuentra altamente regulada, principalmente por los reguladores transcripcionales HilD e InvF, los cuales pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS, e HilA, el cual pertenece a la familia de reguladores transcripcionales OmpR/ToxR (Petrone *et al.*, 2014). Cada uno de estos reguladores transcripcionales, siendo HilD el regulador dominante, activa la expresión del gen *hilA* que codifica para la proteína HilA, la cual induce directamente la expresión de los operones *prg/org* e *inv/spa*. De esta forma, se induce la expresión de otro regulador transcripcional codificado en esta isla, el cual es InvF (Golubeva *et al.*, 2012; Singer *et al.*, 2014). Este regulador induce la expresión del operón *sic/sip*, lo que conlleva a la expresión del resto de los genes de SPI-1 (Altier *et al.*, 2005). A su vez se ha reportado que HilD regula la expresión de genes que se encuentran fuera de SPI-1 como por ejemplo el gen *lpxR*, el cual codifica para una proteína de membrana externa que modifica al lípido A, así modificando el anclaje del lipopolisacárido (LPS) (Petrone *et al.*, 2013).

E. - SPI-2.

Los genes de SPI-2, los cuales abarcan una región cromosómica de 40 kb, se requieren principalmente para la replicación de *Salmonella* dentro de las células del hospedero; su replicación en macrófagos determina en mayor parte que *Salmonella* cause infección sistémica. Esta isla de patogenicidad contiene 44 genes; el operón *ssa* codifica para el aparato SST3-2, el operón *sse* codifica para las proteínas efectoras, el operón *ssc* codifica para las chaperonas y el operón *ssr* codifica para los reguladores transcripcionales SsrA y SsrB (Figura 2) (Fàbrega *et al.*, 2013; Hansen-wester *et al.*, 2001; Worley *et al.*, 2000). SPI-2 es de suma importancia para que *Salmonella* pueda sobrevivir y replicarse intracelularmente

(células epiteliales y/o macrófagos), generando así la infección sistémica (Abrahams *et al.*, 2006; Kolodziejek *et al.*, 2015; Hensel., 2004).

Intracelularmente en macrófagos y una vez formada la SCV (*Salmonella* containing vacuole), el pH ácido, la baja concentración de magnesio, calcio y fosfato, induce la expresión del SST3-2, por el cual se translocan aproximadamente 20 proteínas efectoras de la bacteria hacia la célula hospedera (Haraga *et al.*, 2008). Entre estas proteínas efectoras secretadas se encuentran SigD y SsaB, cuya función principal es evitar que la bacteria sea expuesta a especies reactivas de oxígeno, favoreciendo que la SCV no se fusione con los lisosomas (Figueira *et al.*, 2012). Eventualmente se induce la formación de filamentos llamados “*Salmonella* induced filaments” (Sif), los cuales están involucrados en mantener la integridad e incrementar el tamaño de las SCV. La formación de estas estructuras está determinada principalmente por la translocación de las proteínas efectoras SifA, SseF, SseG, SopD2 y PipB2. Las proteínas efectoras SseF y SseG están involucrados en posicionar a la SCV cerca del Aparato de Golgi, lo cual favorece el tráfico vesicular para la adquisición de nutrientes necesarios para la proliferación de *Salmonella* (Figura 3) (Abrahams *et al.*, 2006; Figueira *et al.*, 2012; Haraga *et al.*, 2008; Kolodziejek *et al.*, 2015).

Se ha reportado que la expresión de SPI-2 es necesaria intracelularmente para que *Salmonella* pueda replicarse, también se ha reportado que se requiere en el lumen intestinal antes de invadir a las células epiteliales (Brown *et al.*, 2005). Varios estudios indican que los genes de SPI-2 se requieren para que la bacteria induzca una respuesta inflamatoria intestinal completa, ya que se ha observado que una cepa mutante de SPI-2, que carece del sistema de secreción tipo III (SST3-2), presenta atenuación en la inflamación intestinal (Bispham *et al.*, 2001; Coburn *et al.*, 2005; Coombes *et al.*, 2005).

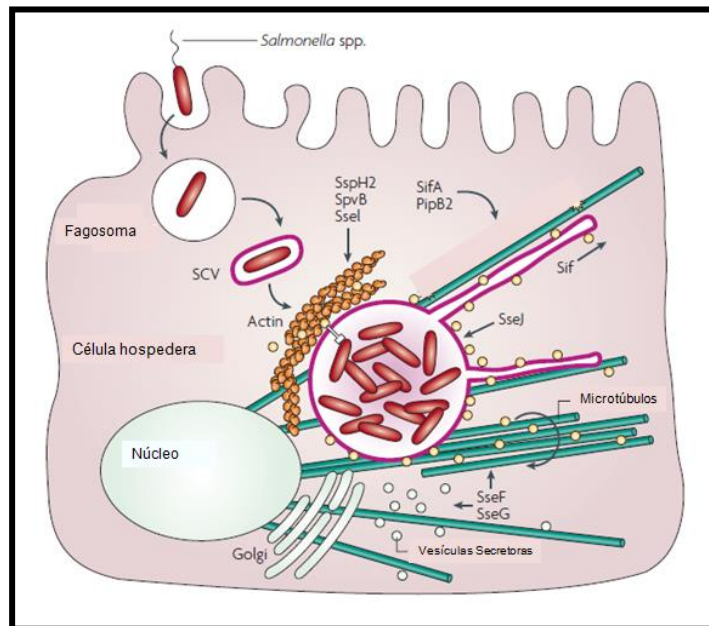


Fig. 3.- Función de SPI-2 en la replicación de *Salmonella* dentro de sus células hospederas. La expresión de SPI-2 se induce en la SCV, expresando el SST3-2 y translocando las proteínas efectoras necesarias (círculos amarillos) para llevar a cabo la formación de Sif (filamento inducido por *Salmonella*) a lo largo de los microtúbulos (verde), posicionando la SCV cerca del aparato de Golgi (Adaptado de Haraga *et al.*, 2008).

De manera consistente a su función, los genes de SPI-2 se expresan cuando *Salmonella* se encuentra intracelularmente dentro de macrófagos o de células epiteliales, así como en el lumen intestinal (Figura 3). *In vitro*, los genes de SPI-2 se expresan cuando *Salmonella* es crecida en medios ricos como LB, en una fase estacionaria tardía, o en medios mínimos, independientemente de la fase de crecimiento (Bustamante *et al.*, 2008).

Con base al patrón de expresión que muestran los genes de SPI-1 y SPI-2 *in vivo* y en medios de cultivo, se considera que las condiciones de crecimiento en medios ricos como LB y en medios mínimos mimetizan, al menos en parte, las condiciones que inducen la expresión de los genes de SPI-2 cuando *Salmonella* se encuentra en el lumen intestinal y en el interior de sus células hospederas, respectivamente (Bustamante *et al.*, 2008; Figueira *et al.*, 2012; Srikumar *et al.*, 2015)

F.- Operón *ssrAB*.

El operón *ssrAB*, el cual se localiza en SPI-2, codifica para el sistema de dos componentes SsrA/SsrB que regula positivamente la expresión de todos los genes de esta isla de patogenicidad, así como la de otros genes de virulencia localizados fuera de SPI-2. SsrA es una proteína sensora cinasa, mientras que SsrB es el regulador de respuesta (Fàbrega *et al.*, 2013; Hoch *et al.*, 2000).

Cuando *S. Typhimurium* se encuentra dentro de la SCV, el pH ácido, la baja osmolaridad y la baja concentración de magnesio generan que SsrA se fosforile y active de esta manera a SsrB, el cual una vez activo, actuará como anti-represor de H-NS sobre sus genes blanco (Fass *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2004; Knodler *et al.*, 2003). La expresión del operón *ssrAB* está controlada por varios reguladores globales, en respuesta al medio ambiente donde se encuentre *Salmonella* (Fass *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2015). Se ha reportado que cuando se crece a *Salmonella* en medios mínimos PhoP, OmpR y SlyA regulan de manera positiva la expresión del operón *ssrAB* (Figura 4A) (Fàbrega *et al.*, 2013; Fass *et al.*, 2009). PhoP induce la expresión del operón *ssrAB* de manera directa, actuando como un anti-represor de H-NS (Will *et al.*, 2014). Se ha reportado que OmpR es un regulador transcripcional que induce de manera directa y positiva la expresión del operón *ssrAB*, sin embargo no se sabe la actividad que ejerce sobre la expresión de este mismo (Cameron *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2000). SlyA es un regulador transcripcional el cual, se ha reportado que para la mayoría de sus genes blanco actúa como un anti-represor de H-NS (Pérez *et al.*, 2008; Stapleton *et al.*, 2002). Asimismo, cuando se crece a *Salmonella* en medios mínimos la expresión de *ssrAB* se reprime por proteínas asociadas al nucleoide (NAP por sus siglas en inglés “*Nucleoid-associated proteins*”), siendo H-NS y YdgT las principales (Figura 4A) (Coombes *et al.*, 2005; Fass *et al.*, 2009). Se ha reportado que YdgT reprime la expresión de los genes de SPI-2 formando heterodímeros con H-NS, inhibiendo directamente la expresión de SPI-2 (Paytubi *et al.*, 2004; Vivero *et al.*, 2008).

Cuando se crece a *Salmonella* en medios ricos en nutrientes, como LB, en una fase estacionaria tardía SlyA, Fis, OmpR y HilD regulan de manera positiva la expresión del operón *ssrAB* (Figura 4B) (Bustamante *et al.*, 2008; Fass *et al.*,

2009; Kelly *et al.*, 2004). Se ha reportado que HiiD actúa como anti-represor de H-NS para la expresión del operón *ssrAB* (Martínez *et al.*, 2014). Fis induce la expresión de los operones *ssr* y *ssa* uniéndose a la región promotora de estos operones (Fass *et al.*, 2009; Kelly *et al.*, 2004). Asimismo, en estas condiciones de crecimiento, la expresión de *ssrAB* también se reprime por H-NS (Figura 4B) (Linehan *et al.*, 2005).

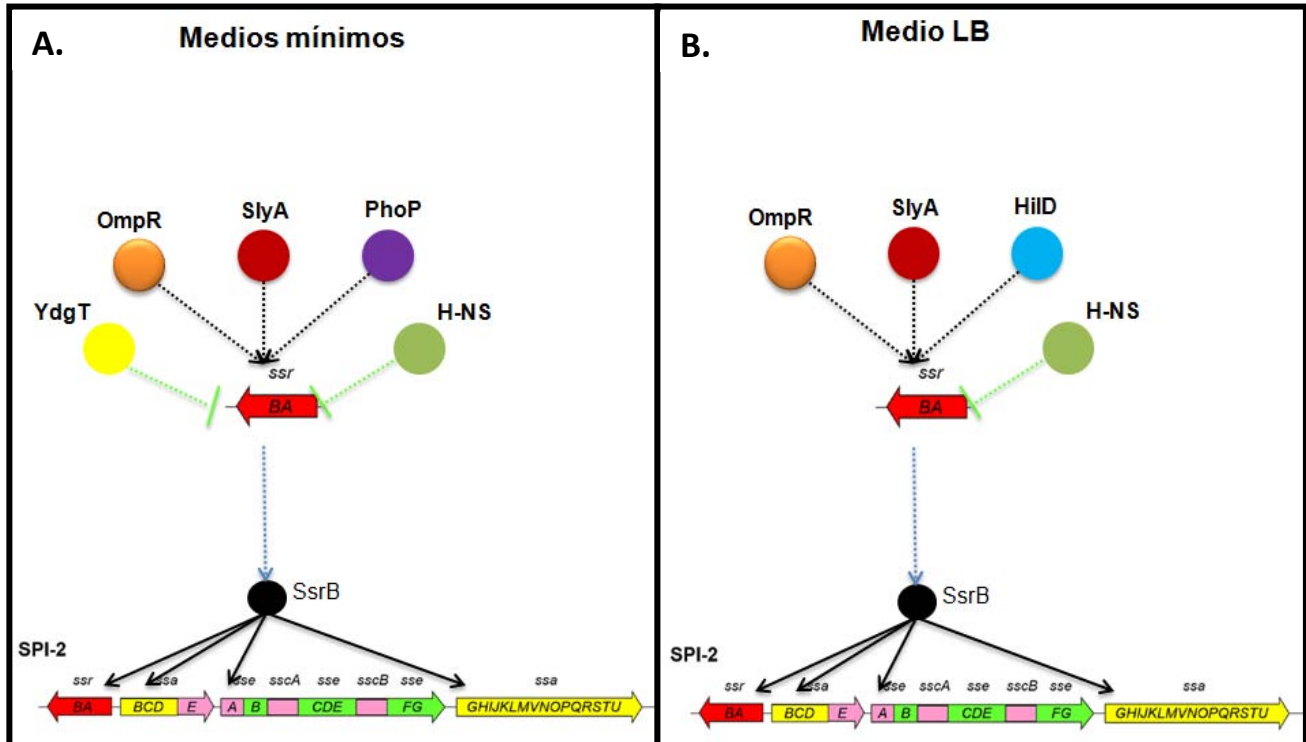


Fig. 4.- Regulación de la expresión de los genes de SPI-2 en dos diferentes condiciones de crecimiento. Reguladores involucrados en la expresión del operón *ssrAB* y por ende los genes de SPI-2, en medios mínimos (A) y en medios ricos como LB, en una fase estacionaria tardía de crecimiento (B). Las flechas negras indican regulación positiva, las flechas verdes fosforescentes indican regulación negativa y las flechas azules indican que el operón *ssrAB* codifica el regulador SsrB.

G.- Regulación de la expresión del operón *ssrAB* por H-NS, HiID, OmpR y SlyA.

G.1.- H-NS.

H-NS es una proteína que se expresa constitutivamente y actúa como un regulador transcripcional global, usualmente como un represor (Lucchini *et al.*, 2006). Hay dos mecanismos por los cuales H-NS reprime: El primero de ellos consiste en que H-NS se une inicialmente a uno o más sitios de alta afinidad, los cuales se encuentran juntos (llamados sitios de nucleación), lo que lleva a su polimerización a lo largo del DNA, formando un filamento nucleoproteínico de represión (Figura 5A) (Baños *et al.*, 2009; Stoebel *et al.*, 2008). El otro mecanismo de represión consiste en que H-NS se une a sitios localizados, tanto río-arriba como río-abajo del promotor, formando un puente DNA-H-NS-DNA, generando un bucle nucleoproteínico de represión (Figura 5B) (Lim *et al.*, 2012).

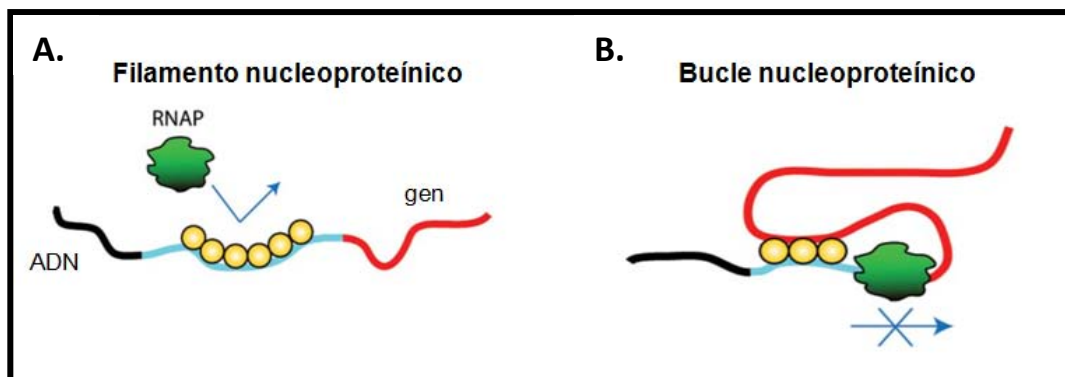


Fig. 5.- Mecanismos por los cuales H-NS reprime a sus genes blanco. (A) Modelo de la formación del filamento nucleoproteínico de represión. (B) Modelo de la formación del bucle nucleoproteínico de represión. En amarillo claro se muestran los monómeros de H-NS (Adaptado de Lim *et al.*, 2012).

Se ha reportado que H-NS reprime la expresión de los genes de SPI-1 y de SPI-2, las cuales contienen secuencias ricas en A+T (Baños *et al.*, 2009). Recientemente se reportó que H-NS reprime la expresión del operón *ssrAB* mediante la formación de un filamento nucleoproteínico sobre la región regulatoria de este operón (Martínez *et al.*, 2014).

G.2.- HilD.

HilD pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC, los cuales regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo del carbono, respuesta a estrés y en la patogénesis (Yang *et al.*, 2013). Se ha reportado que regula positivamente la expresión de los genes de SPI-1, induciendo directamente la expresión de HilA (Altier *et al.*, 2005).

En nuestro grupo se encontró que HilD regula la expresión del operón *ssrAB* y por lo tanto los genes de SPI-2. Interesantemente, se determinó que HilD induce la expresión del operón *ssrAB* cuando se crece a *S. Typhimurium* en medio LB, en una fase de crecimiento estacionaria tardía, pero no se requiere para la expresión de *ssrAB* cuando se crece la bacteria en medios mínimos (Bustamante *et al.*, 2008). Asimismo, se encontró que HilD induce la expresión de *ssrAB* desplazando la represión que ejerce H-NS sobre el promotor de este operón (Martínez *et al.*, 2014).

G.3.- OmpR/EnvZ.

OmpR/EnvZ es un sistema de dos componentes, siendo EnvZ la proteína sensora cinasa y OmpR el regulador de respuesta que activa la transcripción de un gran número de genes, como los que codifican para las porinas OmpF y OmpC (Alphen *et al.*, 1977). De igual manera, regula la expresión del gen que codifica una tripeptido permeasa (*tppB*), así como el que codifica los filamentos inducidos por *Salmonella* (*sifA*), y el gen que codifica para una aciltransferasa (*aas*) (Chakraborty *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 1998).

Cuando la bacteria se encuentra dentro de macrófagos, EnvZ se fosforila, principalmente en respuesta a la baja osmolaridad, así fosforilando así a OmpR, el cual induce directamente la expresión del operón *ssrAB* (Fass *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2000).

En nuestro grupo se encontró que la expresión de *ssrAB* requiere de OmpR aún en ausencia de la actividad de H-NS, indicando que OmpR no actúa como anti-represor de H-NS en la expresión del operón *ssrAB* (Bustamante *et al.*, 2008).

G.4.- SlyA.

SlyA es un regulador transcripcional que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales MarR/SlyA. Se ha reportado que estos reguladores están involucrados en la expresión de genes para resistencia a antibióticos, agentes antimicrobianos, estrés oxidativo, para el catabolismo de compuestos aromáticos e involucrados en la virulencia (Wilkinson *et al.*, 2005).

SlyA regula tanto de manera positiva como de manera negativa la expresión de genes involucrados en la resistencia al estrés oxidativo y a péptidos antimicrobianos. También controla la expresión de varios factores de virulencia de *S. Typhimurium* (Ellison *et al.*, 2006). Dentro de estos genes que codifican para factores de virulencia, se ha reportado que SlyA actúa como anti-represor de H-NS. Interesantemente, para la expresión de varios de los genes blanco de SlyA, se requiere de un efecto cooperativo entre SlyA y PhoP, el cual es el regulador de respuesta del sistema de dos componente PhoQ/PhoP (Perez *et al.*, 2008; Gal-Mor *et al.*, 2011; Navarre *et al.*, 2005).

En trabajos anteriores se ha reportado que una mutación nula de *slyA* afecta la habilidad de *S. Typhimurium* de sobrevivir y replicarse dentro de macrófagos, atenuando la virulencia de la bacteria (Corbett *et al.*, 2007). Se determinó que SlyA induce la expresión del operón *ssrAB* (Feng *et al.*, 2004) uniéndose a la región reguladora de este mismo (Okada *et al.*, 2007). Weatherspoon y colaboradores determinaron un probable sitio de unión de SlyA en la región río arriba del operón *ssrAB*, la cual consiste en el hexámero nucleotídico repetido ATTATT-(10nt)-ATTATT. Por lo tanto, estos estudios indican que SlyA regula directamente la expresión del operón *ssrAB*.

SlyA regula a sus genes blanco actuando como dímero. Se determinó la estructura cristalográfica del monómero de SlyA, el cual contiene dos dominios funcionales: uno es el dominio de unión a DNA formado por dos alfa hélices, con una estructura hélice-vuelta-hélice (HTH), y el otro es un dominio de dimerización formado por tres alfa hélice (Figura 6) (Dolan *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2003).

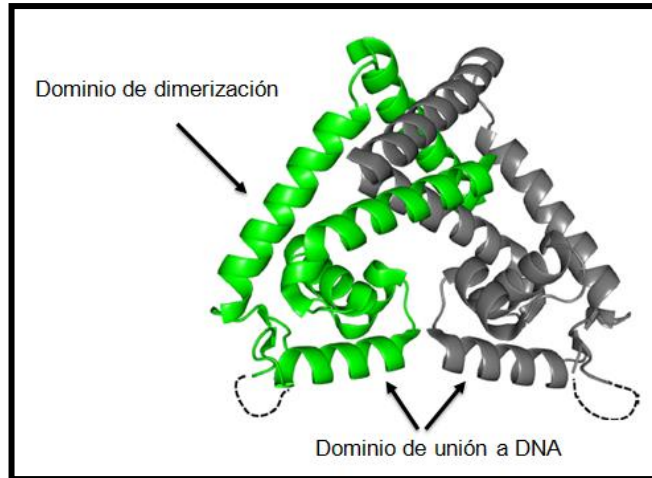


Fig. 6.- Estructura del dímero de la proteína SlyA. Se señalan el dominio de unión a DNA y el de dimerización (Adaptado de Dolan *et al.*, 2011).

II. ANTECEDENTES

Expresión del operón *ssrAB* mediada por SlyA, OmpR y HilD.

Diferentes estudios han mostrado que cuando se crece a *Salmonella* en medios mínimos la expresión del operón *ssrAB*, y por lo tanto la de los genes de SPI-2, es controlada por los reguladores OmpR, SlyA y PhoP (Figura 4) (Fábrega *et al.*, 2013). Interesantemente, en nuestro grupo se encontró que *ssrAB* también se expresa cuando se crece a *Salmonella* en medios ricos como en LB, en una fase estacionaria tardía de crecimiento, y que en estas condiciones su expresión se controla por los reguladores OmpR y HilD (Figura 4) (Bustamante *et al.*, 2008). Esto reveló un novedoso mecanismo de comunicación entre las dos principales islas de patogenicidad de *Salmonella*, donde HilD, codificado en SPI-1, se requiere para la expresión de *ssrAB*, localizado en SPI-2. Resultados adicionales de nuestro grupo han mostrado que HilD induce la expresión de *ssrAB* desplazando la represión que ejerce el regulador global H-NS sobre el promotor de este operón (Martínez *et al.*, 2014), lo cual podría permitir su activación mediada por OmpR. Como HilD no se requiere para la expresión de *ssrAB* en medios mínimos (Bustamante *et al.*, 2008), se proponía que SlyA reemplazaba su función en estas condiciones, actuando como antagonista de H-NS. Esto con base a que SlyA actúa de esta manera para inducir la expresión de la mayoría de sus genes blanco (Ellison *et al.*, 2006). Sin embargo, recientemente en nuestro grupo se demostró que SlyA también se requiere para la expresión de *ssrAB* en LB (Figura 7A) y que en ausencia de la región donde actúa H-NS para reprimir a *ssrAB*, SlyA ya no es necesario para la expresión de este operón (Figura 7B y 7C). En conjunto, estos resultados sugieren que SlyA actúa como un segundo anti-represor de H-NS en *ssrAB*. Así, nuestro modelo actual de regulación de *ssrAB* propone que HilD y SlyA quitan la represión que ejerce H-NS, lo cual permite que OmpR actúe como activador clásico (Figura 8).

En este proyecto nos interesó definir el papel de SlyA en la regulación de la expresión del operón *ssrAB* y determinar cómo se coordinan SlyA, HilD y OmpR para inducir la expresión de este operón y por ende los genes de SPI-2 en medio LB, en una fase estacionaria tardía de crecimiento; condiciones las cuales

mimetizan las encontradas en el lumen intestinal antes de invadir a las células epiteliales para inducir una respuesta inflamatoria.

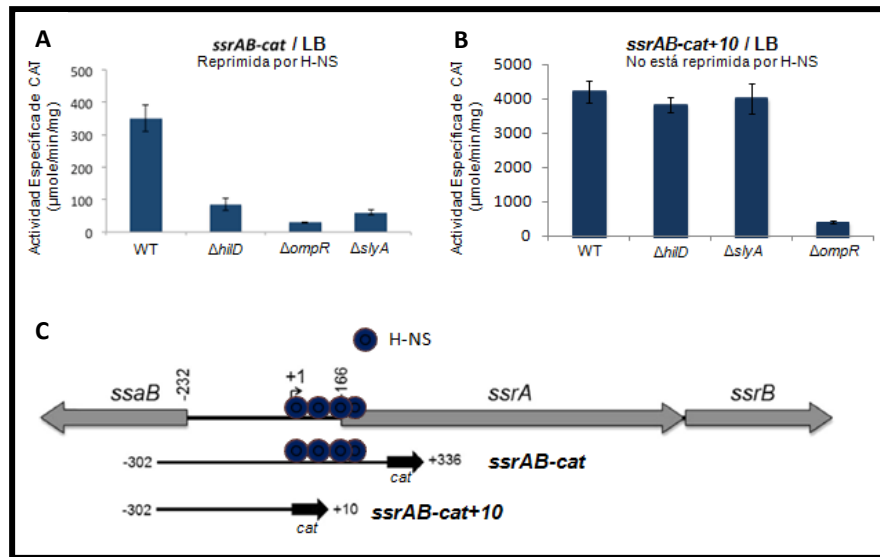


Fig. 7.- Regulación del operón *ssrAB* por HilD, OmpR y SlyA. La expresión de las fusiones transcripcionales *ssrAB-cat-302+478* (A) y *ssrAB-cat-302+10* (B), presentes en los plásmidos *pssrAB-cat* y *pssrAB-cat+10*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y en sus derivadas mutantes $\Delta hilD$, $\Delta ompR$ y $\Delta slyA$ crecidas en LB a 37 °C. La fusión *ssrAB-cat* contiene todos los elementos de regulación de *ssrAB*, incluyendo la represión por H-NS, mientras que la fusión *ssrAB-cat+10* carece de la región necesaria para la represión de *ssrAB* por H-NS (C). SlyA y HilD se requieren para la expresión de la fusión *ssrAB-cat* pero no para la expresión de la fusión *ssrAB-cat+10*, mientras que OmpR se requiere para la expresión de ambas fusiones (Bustamante *et al* datos no publicados).

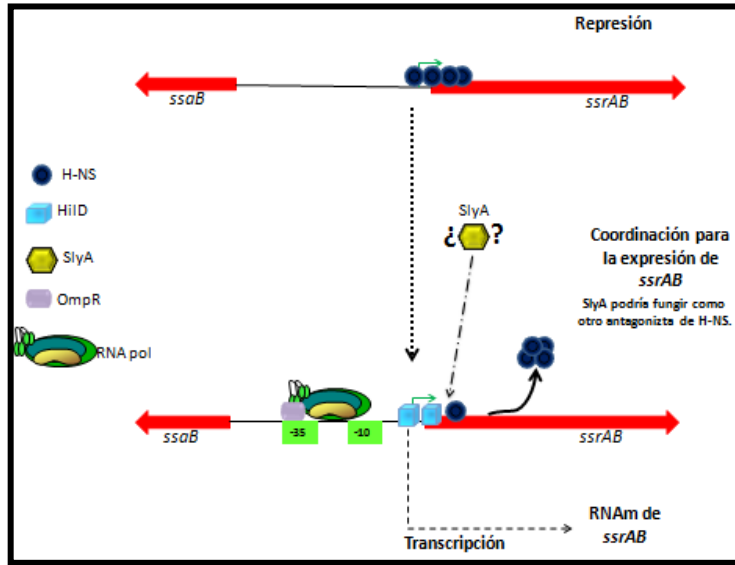


Fig. 8.- Modelo actual de regulación de la expresión de *ssrAB* en LB. H-NS ejerce un doble mecanismo de represión en el operón *ssrAB*, uniéndose a varios sitios localizados sobre el promotor y corriente abajo de éste. HiID se une cerca o sobre algunos de estos sitios y así desplaza una parte de las moléculas de H-NS unidas en *ssrAB*, contrarrestando de esta manera uno de los mecanismos de represión por H-NS. Proponemos que SlyA elimina el segundo mecanismo de represión por H-NS, lo cual permite la unión de OmpR que favorece la unión de la RNA polimerasa al promotor de *ssrAB* y, por lo tanto, la transcripción de este operón.

III. HIPÓTESIS

La expresión de *ssrAB* requiere de la acción cooperativa de los reguladores SlyA, HilD y OmpR; SlyA y HilD desplazan la represión que ejerce H-NS, lo cual permite que OmpR active la transcripción de este operón.

IV. OBJETIVOS

General.

Dilucidar el mecanismo por el cual SlyA, HilD, OmpR y H-NS regulan la expresión de *ssrAB*.

Particulares.

- Determinar si SlyA se requiere para la expresión de *ssrAB* en presencia o no de H-NS funcional.
- Determinar si SlyA puede desplazar a la proteína H-NS unida a la región reguladora de *ssrAB*.
- Determinar si se requiere tanto la presencia de SlyA como la de HilD para desplazar por completo la represión mediada por H-NS sobre *ssrAB*.
- Determinar cómo se coordinan SlyA, HilD y OmpR para inducir la expresión de *ssrAB*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

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

Tabla 1.- Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepas	Descripción	Origen o referencias
<u>S. Typhimurium</u>		
WT	Cepa Silvestre SL1344, Stp ^R	Hoiseh and Stocker, 1981
$\Delta slyA::Km$	Derivada de SL1344, $\Delta slyA::Km$, Stp ^R , Km ^R	Martínez et al., 2014, no publicado
$\Delta slyA::$	Derivada de $\Delta slyA::Km$, sin casete de Km, Stp ^R	Este trabajo
$\Delta hilD::Km$	Derivada de SL1344, $\Delta hilD::Km$ Stp ^R , Km ^R	Bustamante et al., 2008.
$\Delta hilD::$	Derivada de $\Delta hilD::Km$, sin casete de Km, Stp ^R	Martínez et al., 2011.
$\Delta hilD \Delta slyA::Km$	Derivada de $\Delta hilD::$, $\Delta hilD \Delta slyA::Km$ Stp ^R , Km ^R	Este trabajo
$\Delta hilD \Delta slyA::$	Derivada de $\Delta hilD \Delta slyA::Km$: sin casete de Km Stp ^R	Este trabajo
$\Delta ompR::Km$	Derivada de SL1344, $\Delta ompR::Km$ Stp ^R , Km ^R	Bustamante et al., 2008.
$\Delta ompR::$	Derivada de $\Delta ompR::Km$, sin casete de Km Stp ^R	Martínez et al., 2011.
$ssrA::3xFLAG$	Derivada de SL1344, expresa la proteína SsrA-FLAG	Bustamante et al., 2008.
$\Delta slyA::Km ssrA::3xFLAG$	Derivada de $\Delta slyA::Km$; expresa la proteína SsrA-FLAG	Este trabajo
$\Delta slyA:: ssrA::3xFLAG$	Derivada de $\Delta slyA::Km ssrA-FLAG$, sin casete de Km Stp ^R	Este trabajo
$\Delta hilD::Km ssrA::3xFLAG$	Derivada de $\Delta hilD::Km$, expresa la proteína SsrA-FLAG	Bustamante et al., 2008.
$\Delta ompR::Km ssrA::3xFLAG$	Derivada de $\Delta ompR::Km$, expresa la proteína SsrA-FLAG	Bustamante et al., 2008.
$\Delta hilD \Delta slyA::Km ssrA::3xFLAG$	Derivada de $\Delta hilD \Delta slyA::Km$, expresa la proteína SsrA-FLAG	Este trabajo

E. coli

DH10 β	Cepa de laboratorio, Stp ^R	Invitrogen.
BL21/DE3	Cepa para la expresión de proteínas recombinantes	Invitrogen.
M15(pREP4)	Cepa para la expresión de proteínas recombinantes, Km ^R	Qiagen.

Tabla 2.- Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Origen o referencias
pMPM-T6 Ω	Vector de clonación, origen de replicación p15A, con un promotor inducible con arabinosa, Tc ^R	Meyer <i>et al.</i> , 1995.
pT6-HNS-WT	Derivado de pMPM-T6 Ω , expresa H-NS silvestre bajo un promotor inducible con arabinosa, Tc ^R	Bustamante <i>et al.</i> , 2008.
pT6-HNS-G113D	Derivado de pMPM-T6 Ω , expresa H-NS dominante negativo, mutado en su C-terminal en la posición 113 (H-NS ^{G113D}), bajo un promotor inducible con arabinosa, Tc ^R	Bustamante <i>et al.</i> , 2008.
pQE30	Vector de expresión de proteínas recombinantes, bajo un promotor inducible con IPTG, Amp ^R	Qiagen.
pQE30-His-HA-SlyA	Derivado de pQE30, expresa a la proteína His-HA-SlyA, bajo un promotor inducible con IPTG, Amp ^R	Este trabajo
pMPM-K3	Vector de clonación de bajo número de copias, origen de replicación p15A, bajo un promotor inducible con IPTG, Km ^R	Meyer <i>et al.</i> , 1995.
pK3-SlyA	Derivado de pMPM-K3, expresa SlyA silvestre, bajo un promotor inducible a IPTG, Km ^R	Este trabajo
pMPM-K6	Vector de clonación de bajo número de copias, origen de replicación p15A, bajo un promotor inducible a arabinosa, Km ^R	Meyer <i>et al.</i> , 1995.
pK6-HilD	Derivado de pMPM-K6 expresando HilD silvestre, bajo un promotor inducible a arabinosa, Km ^R	Paredes <i>et al.</i> , no publicado

pKK232-8	Derivado de pBR322, contiene el gen <i>cat</i> (cloramfenicol acetil transferasa) sin promotor, empleado para la construcción de fusiones transcripcionales; Amp ^R	Pharmacy LKB Biotechnology (Brosius, 1984).
pslyA-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>slyA-cat</i> , con la región -508 a +51 de <i>slyA</i> , Amp ^R	Este trabajo
philD-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilD-cat</i> , con la región -344 a +88 de <i>hilD</i> , Amp ^R	Bustamante <i>et al.</i> , 2008.
pssrAB-cat-302+478	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssrAB-cat</i> , con la región nucleotídica -302 a +478 de <i>ssrAB</i> , Amp ^R	Martínez <i>et al.</i> , 2014.
pssrAB-cat-302+10	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssrAB-cat</i> , con la región nucleotídica -302 a +10 de <i>ssrAB</i> , Amp ^R	Martínez <i>et al.</i> , 2014.
pssaG-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssaG-cat</i> , con la región nucleotídica -303 a +361 de <i>ssaG</i> , Amp ^R	Bustamante <i>et al.</i> , 2008.
pCP20	Plásmido que expresa la recombinasa FLP, con un promotor inducible a la temperatura, Amp ^R	Datsenko <i>et al.</i> , 2000

Tabla 3.- Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Modificación
Construcción de la proteína SlyA-HA-His.		
SlyA/HA/His-F	GAT <u>GGATCC</u> TCTATCCGTATGATGTTCTGATTATGCTAGCCAA ATTCGAATCGCCACTAGGTTC	<i>Bam</i> HI. Epítotope HA
SlyA/HA/His-R	CTA <u>AAGCTT</u> TGTCGTGCTCGCCAGCAACG	<i>Hind</i> III
Construcción de la fusión <i>slyA-cat</i>		
SlyA-FW44	CAC <u>GGATCC</u> AGAACGGCGACGACGGC	<i>Bam</i> HI
SlyA-RV33	ACG <u>AAGCTT</u> GCGCACCAACCGTGCCAGATC	<i>Hind</i> III
Ensayos de retardo		
SsaBF	GGCTAAGATCTTCGGCCCTGATATCCTG	Gen Blanco <i>ssrAB</i>
SsrBRS6E	TTGGTCGACCGACAGATAGATGCCGG	<i>ssrAB</i>
SigD-BH1F	TCCCGACAGGATCCTTTTACCC	<i>sigD</i>
SigD-RV1	ATCATGGGGGAGATCGGTAC	<i>sigD</i>
SlyA-FW44	CACGGATCCAGAACGGCGACGACGGC	<i>slyA</i>
SlyA-RV33	ACGAAGCTTGCGCACCAACCGTGCCAGATC	<i>slyA</i>
UgtL-Fw	CGAGGATCCGAGCGTTGAGAGATAGCACT	<i>ugtL</i>
UgtL-Rv	CGAAAGCTTCCAGGATGCTGTCTTTTC	<i>ugtL</i>
HilDF <i>Bam</i> HI	AAT <u>GGATCC</u> TACAGCCGTTCAAGTGAG	<i>hilD</i>
HilDR <i>Hind</i> III	CTG <u>AAGCTT</u> ATCTGCGGCAGGACGC	<i>hilD</i>
SirAF- <i>Bam</i> HI	GCC <u>GGATCC</u> ATCGCCTGCAGCATCAGC	<i>sirA</i>
SirAR- <i>Hind</i> III	AGC <u>AAGCTT</u> CACCGACAACCTTAATGC	<i>sirA</i>
HilA1F <i>Bam</i> HI	ATC <u>GGATCC</u> CTCTGAGAACTATTTGC	<i>hilA</i>

Tabla 4.- Antibióticos y dosis empleadas en este trabajo

Estreptomicina (Str)	100 µg/ml
Ampicilina (Amp)	200 µg/ml
Kanamicina (Km)	20 µg/ml
Tetraciclina (Tc)	12 µg/ml

A. Generación de las cepas *S. Typhimurium* SL1344 Δ hilD Δ slyA, Δ slyA::Km ssrA::3xFLAG y Δ hilD Δ slyA::Km ssrA::3xFLAG

En nuestro grupo de laboratorio ya se contaba con el fago (P22) que contiene el alelo Δ slyA::Km y también el alelo ssrA::3xFLAG. Al tubo que contiene al P22 con nuestras regiones de interés se le agregó 3 gotas de cloroformo, después se resuspendieron mediante agitación con el vórtex y se centrifugó 1 min a 15,000 rpm. Esto se realizó con el fin de separar algún remanente celular que haya quedado en la solución del fago.

Se puso un cultivo de la cepa *S. Typhimurium* SL1344 Δ hilD, ssrA::3xFLAG y Δ hilD Δ slyA::Km en 5 ml de medio LB y su respectivo antibiótico toda la noche. Después se hicieron mezclas del fago Δ slyA::Km con la cepa Δ hilD, Δ slyA::Km con la cepa ssrA::3xFLAG, ssrA::3xFLAG con la cepa Δ hilD Δ slyA::Km tomando del sobrenadante del tubo donde está el P22, en las siguientes cantidades:

Tubo	Células (ml)	Fago P22 (ml)
A	200 µL	-
B	-	5 µL
C	200 µl	1 µL
D	200 µL	5 µL
E	200 µL	20 µL

Tabla 5.- Combinaciones y cantidades utilizadas, de células bacterianas y el fago P22 en los experimentos de transducción para la generación de las cepas mutantes.

En el tubo B se puso 200 µl de medio LB estéril; se dejó incubando 15 min a temperatura ambiente, para que se dé la incorporación del fago en la bacteria. Después se agregó 1 ml de medio LB, se dejó incubando 1 h a 37°C y se centrifugó 1 min a 15,000 rpm. Se re-suspendió en 1 ml de medio LB y se volvió a centrifugar 1 min a 15,000 rpm (este paso se volvió a repetir una vez más).

Al final, se re-suspendió el pellet en 200 µl de medio LB y se plaqueó 100 µl en medio LB más el antibiótico de selección, que en este caso es kanamicina (Ver tabla de cepas).

Después, las colonias obtenidas se estriaron para obtener colonia sencilla en cajas con el antibiótico kanamicina para eliminar los fagos que puedan quedar en la cepa (este paso se vuelve a repetir una vez más).

B. Generación de las cepas *S. Typhimurium* SL1344 Δ slyA::, Δ hilD Δ slyA:: y Δ slyA:: ssrA::3xFLAG.

Las cepas de interés a las cuales se les quiso eliminar el casete de Km se cultivaron en 5 ml de LB junto con los antibióticos adecuados, incubándose durante toda la noche a 37 °C con agitación a 200 rpm.

Se hicieron células electrocompetentes de estas cepas y se les añadió 10 µl del plásmido pCP20 para introducirlo por electroporación. Posteriormente se dejó recuperando de 2-3 horas a 37 °C y después se sembraron 200 µl en cajas de Petri con medio agar LB con sus respectivos antibióticos. Se tomaron 10 colonias de las cepas transformantes y se estriaron en cajas de Petri con medio agar LB sin antibióticos. Para determinar si estas cepas ya habían perdido el casete de kanamicina, se volvieron a estriar en cajas de Petri con medio agar LB con kanamicina, de las colonias que no hayan crecido en este medio, se toman de las estriadas en medio agar LB sin antibiótico, y se crecen en 5 ml de LB adicionando kanamicina, esto con el fin de observar que definitivamente hayan perdido la resistencia.

Se preparó medio agar LB + 10 % de sacarosa, en este mismo se estrió a colonia sencilla las colonias que no hayan crecido en medio líquido LB con kanamicina, tomando la colonia de la caja de Petri con medio agar LB sin antibióticos, y se dejó

incubando ON a 37°C. De esto se tomaron 10 colonias y se estriaron en cajas con medio agar LB sin antibióticos incubando ON a 37°C. Posteriormente se estrió estas mismas colonias en cajas con medio agar LB con ampicilina.

De las colonias que no crecieron en medio agar LB con ampicilina se inocularon en medio líquido de LB con ampicilina, dejando incubando ON a 37°C. Se tomó la colonia que no creció en medio líquido LB con ampicilina de la caja de Petri con medio LB sin antibióticos, y se inoculo en medio líquido LB sin antibióticos, incubando ON a 37°C. Posteriormente mediante PCR se verificó que efectivamente hubieran perdido el casete de Km.

C. Generación del plásmido que contiene la fusión transcripcional *slyA-cat*.

Utilizando oligonucleótidos específicos que contienen los sitios de restricción necesarios (Tabla 3), se amplificó la región reguladora del gen *slyA* mediante PCR. En la figura 9 se esquematiza la región que fue amplificada y empleada para la construcción de la fusión. El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE (Tris-Acetato-EDTA 0.5X, pH 8.0) a 80 V. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 µl/mg) y el DNA visualizado en un transiluminador de luz UV de onda corta (Sigma) permitió identificar la banda del tamaño correspondiente a la región amplificada para cortarla y purificarla mediante el kit “Zymoclean Gel DNA Recovery Kit” (Zymo Research). Posteriormente, el fragmento y el plásmido pKK232-8 (Tabla 2) fueron digeridos con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*. Las digestiones dobles fueron purificadas mediante el kit “DNA Clean and Concentrator” (Zymo Research) y se visualizaron en un gel de agarosa al 1%. De acuerdo a las cantidades observadas en éste, el producto de PCR y el vector pKK232-8 se ligaron poniéndolos en la reacción de ligación en una proporción aproximada de 3:1 molar.

En las reacciones de ligación, primero se mezcló el fragmento de DNA que se quería clonar y el fragmento de DNA del vector linearizado. Esta reacción se incubó a 16°C toda la noche; al día siguiente la ligación se precipitó usando glicógeno, para lo cual se les agregó 1 µl de glicógeno (20 mg/ml) (Roche) y posteriormente 500 µl de etanol absoluto, se dejó incubar durante 30 min a -20 °C.

Posteriormente se centrifugaron 15 min a 14,000 rpm, decantando el sobrenadante obtenido. Se agregó 1 ml de etanol al 70% y se volvió a centrifugar en las condiciones anteriores, desechando perfectamente el sobrenadante. Los tubos se secaron en Speedvac sc100 (Savant) y se resuspendieron en 10 μ l de agua mili Q, de los cuales 5 μ l se utilizaron para transformar la cepa *E. coli* DH10 β .

Para confirmar que la clonación del fragmento de *slyA* en el plásmido pKK232-8 se purificó plásmidos de varias transformantes de *E. coli* DH10 β mediante un protocolo de extracción de plásmidos por lisis alcalina (miniprep), mismos que fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%. Aquéllos plásmidos que contenían un inserto, fueron utilizados para amplificar por PCR el inserto que contenían y así corroborar su tamaño. Se seleccionaron los plásmidos que tuvieran el inserto correcto y se purificaron con el kit "High Pure Plasmid Isolation Kit" (Roche). Finalmente se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM para obtener y verificar la secuencia de nucleótidos. De esta forma se obtuvo el plásmido *pslyA-cat* que contiene la fusión transcripcional del gen *slyA* al gen reportero *cat* (Tabla 2).

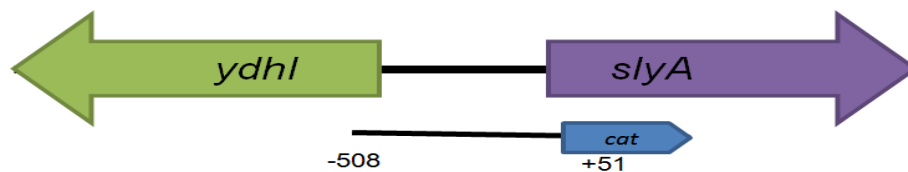


Fig. 9.- Esquema de la fusión transcripcional *slyA-cat*. Se muestran las posiciones que abarca la región contenida en esta fusión, con respecto al inicio de la transcripción de *slyA*.

D. Purificación de plásmidos.

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

Los 5 ml de los cultivos se concentraron centrifugando consecutivamente 1 min a 15,000 rpm y desechando el sobrenadante. Las pastillas de bacterias se re-suspendieron en 150 µl de buffer SET. Posteriormente se agregaron 8 µl de RNAsa (10 mg/ml) y esta suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Transcurrido ese tiempo las bacterias se lisaron al agregarse 400 µl de solución de lisis (NaOH 0.2 M, SDS 1%) e incubando en hielo. Después de 5 min se agregaron 300 µl de acetato de amonio 7.5 M pH 7.8 y se incubó en hielo durante 10 min más, para después centrifugar durante 10 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se le agregó 500 µl de isopropanol. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y después se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue desechado y se agregó 1 ml de etanol al 70%. Posteriormente se centrifugó durante 10 min a 15,000 rpm, el sobrenadante fue desechado y la pastilla de DNA se secó completamente, para finalmente re-suspenderla en 60-100 µl de agua mili Q.

E.- Preparación de células electrocompetentes.

Las cepas de interés se inocularon en 5 ml de LB con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al otro día se tomó 1 ml de estos cultivos para inocular un matraz de 250 ml con 100 ml de LB adicionado con los mismos antibióticos. Estos cultivos se incubaron durante 2 a 3 horas a 37°C a 200 rpm, hasta que alcanzaron una $D.O_{600nm}$ de λ de 0.6 a 0.8. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron por 10 min a 8,000 rpm a 4°C en tubos Nalgene ®, se desechó el sobrenadante, la

pastilla se lavó con 40 ml de agua mili Q fría estéril y se centrifugó en las mismas condiciones. Después, el sobrenadante se desechó, se re-suspendió la pastilla en 40 ml de glicerol al 10% estéril frío y se procedió a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, se desechó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió en 500 µl de glicerol al 10% estéril frío.

F.- Electroporación.

Se mezclaron 50 µl de células electrocompetentes con 10-20 µl de DNA plasmídico. Esta mezcla se colocó en una celda de electroporación fría (BIORAD) y se le dio un pulso eléctrico de 2.5 kV durante 5.5 ms usando un electroporador “*E. coli* pulser” (BIORAD). Posteriormente se agregó a la celda 1 ml de medio de cultivo SOC y se mezcló, después se transfirió a un tubo de ensayo y se incubó durante 1-3 horas a 37°C en agitación a 200 rpm. Finalmente, se sembraron 250 µL del cultivo en cajas de Petri con medio LB solidificado con agar al 1.5% con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C durante 16 horas aproximadamente.

G.- Preparación de los cultivos bacterianos para cuantificación de la expresión de los genes *ssaG* y *ssrAB* de la isla SPI-2.

G.1.- Medio LB.

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

Posteriormente se centrifugaron todas las muestras durante 1 min a 15,000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas obtenidas se lavaron con 900 µl de solución de lavado TDTT (Tris-HCl, pH 7.8 50 mM, y DL-ditiotreitol 30 µM). Después de centrifugar en las mismas condiciones se desechó el sobrenadante.

En caso de no utilizar las pastillas inmediatamente, se almacenaron a -20°C , de lo contrario, se re-suspendieron en 800 μl de TDTT.

G.2.- MM-N

Al igual que en medio LB, las cepas que contienen los plásmidos que llevan las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, se inocularon en 5 ml de medio LB adicionado los antibióticos para los que tienen resistencia y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente se hicieron dos pastillas centrifugando 1.5 ml de los cultivos y se les dio un lavado con 1 ml de medio MM-N. Posteriormente las pastillas se re-suspendieron en 500 μl de MM-N y con cada una de ellas se inocularon dos matraces con 50 ml de MM-N. Los cultivos se incubaron durante 16 horas a 37°C en agitación a 200 rpm, después de este tiempo se tomó una muestra de 1.5 ml, también midiéndose la densidad óptica de los cultivos a 600 nm. Las muestras se centrifugaron durante 1 min a 15,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Las pastillas obtenidas se lavaron con 900 μl de solución de lavado TDTT. En caso de no utilizar las pastillas inmediatamente, se almacenaron a -20°C , de lo contrario, se re-suspendieron en 800 μl de TDTT.

H.- Cuantificación de la actividad específica de CAT (Cloramfenicol Acetil Transferasa).

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

Para la cuantificación de las proteínas totales de los sobrenadantes obtenidos se utilizaron placas de cultivo celular de 96 pozos (Costar), donde se agregaron por

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

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

Finalmente, la actividad específica de CAT (μ mol/min/mg) se obtuvo al dividir las unidades de actividad de CAT entre la concentración de proteínas totales de cada muestra.

I.- Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos de los ensayos de cuantificación de la actividad específica de CAT fueron analizados mediante análisis unidireccional de varianza (ANOVA) con la prueba de comparación múltiple Dunnett. Este análisis estadístico se realizó usando el programa Prism 5 versión 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA).

J.- Inmunodetección de la proteína SsrA-FLAG mediante “Western blot”.

Se crecieron las cepas de acuerdo a lo descrito en el apartado de “Preparación de los cultivos bacterianos para cuantificación de la expresión de los genes *ssaG* y *ssrAB* de la isla SPI-2”. Se toman muestras de 1 ml y se centrifugaron durante 1 min a 15,000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas de bacterias obtenidas fueron resuspendidas en 300 µl de amortiguador de Laemmli SDS-PAGE 1X. Estas muestras se calentaron a 95 °C durante 5-10 min y se visualizó el extracto de proteínas totales en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%, usando amortiguador de corrida Tris-Glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0.1%).

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

Posteriormente, la membrana se incubó en agitación durante 4 horas con los anticuerpos monoclonales anti-FLAG M2 (SIGMA) o policlonales anti-GroEL (StressGen), diluidos en PBST 1:2000 y 1:100000 respectivamente. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó 3 veces con PBST en agitación durante 15 minutos cada uno. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón (1:10000) (PIERCE) para detectar al anticuerpo anti-FLAG y el anti-conejo (1:10000) para detectar al anticuerpo anti-GroEL. Las membranas se mantuvieron en agitación durante una hora. Se realizaron de nuevo 3 lavados durante 15 minutos, con PBST en agitación.

A continuación se agregó a la membrana una mezcla 1:1 de los reactivos para revelado “enhanced luminol reagent” y “oxidizing reagent” del estuche comercial para revelado “Western Lightning Chemiluminiscense Reagent Plus” (Perkin Elmer 58 Life Sciences) y éstas se mantuvieron en agitación durante 1 minuto.

Finalmente las membranas se expusieron en películas radiográficas (KODAK-Omat-LS-film).

K.- Expresión y purificación de las proteínas His-HA-SlyA y H-NS-FH.

La expresión de las proteínas His-HA-SlyA y H-NS-FH se realizó a partir de los plásmidos pQE30-His-HA-SlyA y pBAD-H-NS-FH (Tabla 2) contenidas en las cepas M15 (pREP4) y BL21/DE3 respectivamente. Primero se inoculó un cultivo con 5 ml de LB con el respectivo antibiótico de cada cepa, se dejó crecer toda la noche a 37°C. Se re-inoculó tomando 500 μ l del cultivo hacia un matraz con 200 ml de LB con el respectivo antibiótico de cada cepa, y se dejó crecer a 37°C hasta alcanzar una D.O. 600nm de λ de 0.6. Después se indujo la expresión de las proteínas His-HA-SlyA y H-NS-FH agregando 1mM de IPTG (isopropil- β -D-thiogalactopiranosido) a sus respectivos cultivos e incubando 4 horas a 30°C. Posteriormente, las células bacterianas se colectaron por centrifugación durante 8 min a 8,000 rpm a 4°C y se lavó con 40 ml de buffer de lisis (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazol, pH 8). La pastilla celular se resuspendió con 10 ml del buffer de lisis, posteriormente se separó en alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf de 1.5 ml para sonicarse durante 8 min, combinando pulsos de 9.9 seg, con descansos de 9.9 seg, en un sonicador "Soniprep 150 Sonicator" (Sonics and Materials Inc.). El sobrenadante se colectó en un tubo falcón de 15 ml, se añadió 20 μ l de RNAsa (10mg/ml) y 10 μ l de DNAsa (10mg/ml), incubándose de 10-15 min en hielo. Después se le añadió 450 μ l de inhibidor de proteasas, se centrifugó 30 min a 8,000 rpm y el sobrenadante se pasó a un tubo falcón de 15 ml limpio.

En una columna desechable de 15 ml se empacaron 3 ml de resina de níquel (Qiagen), se lavó con 20 ml de agua mili Q estéril y después se equilibró con 50 ml del buffer de lisis (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM imidazol, pH 8). El extracto soluble que contenía la proteína fusionada al epítipo de 6X His fue adicionado a la columna de níquel y ésta fue lavada con 20 volúmenes del buffer de lavado (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM imidazol, pH 8) para remover las proteínas unidas inespecíficamente. Por último, las proteínas unidas a la resina se eluyeron con el buffer de elución (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250mM

imidazol, pH 8), colectando fracciones de 1 ml. Las fracciones colectadas se analizaron en un gel de policarilamida al 15%, en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) para estimar su grado de pureza. Aquellas fracciones con alto grado de pureza y concentración de la proteína purificada fueron cargadas en un casete para diálisis "Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassette" (Thermo) y mantenidas dentro del casete en agitación a 4°C en un amortiguador de diálisis [Tris pH 8 20 mM, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT (1, 4-Ditiotreitol) y 20% de glicerol (v/v)]. Para cuantificar la concentración de la proteína purificada se empleó el método Bradford usando el kit "Quick Start Bradford Protein Assay" (Bio-Rad). Las proteínas His-HA-SlyA y H-NS-FH purificadas se guardaron en alícuotas de 50µl a -70°C.

L.- Ensayos de retardo en gel (EMSA's Electrophoretic Mobility Shift Assays) con DNA.

Las regiones reguladoras de los genes *ssrAB*, *slyA*, *ugtL*, *pagC* y *sigD* fueron amplificadas mediante PCR usando DNA cromosomal de *S. Typhimurium* SL1344 (Tabla1) y los respectivos oligonucleótidos específicos (Tabla 3). Los productos de PCR fueron purificados usando el kit "DNA Clean and Concentrator" (Zymo Research). Aproximadamente 100 ng de cada uno de los diferentes fragmentos de DNA y 100 ng del fragmento *sigD* (control negativo) se incubaron con concentraciones crecientes de las proteínas purificadas His-H-SlyA, H-NS-FH o MBP-HilD, en una reacción con volumen total de 20 µl. Las reacciones de retardo fueron realizadas en el buffer de unión que contiene Tris pH 9 10 mM, KCl 50 mM y 0.1% de Tritón X-100, incubando 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los complejos proteína-DNA se analizaron en un gel de poliacrilamida al 6%, en condiciones no desnaturizantes, usando amortiguador de corrida Tris-boratos-EDTA 0.5X. Para la detección de los fragmentos de DNA, los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml y se visualizaron en un transiluminador con luz UV de onda corta (Alpha-Imager UV transiluminator Innotech Corp.).

VI. RESULTADOS.

VI.1. SlyA regula positivamente la expresión del operón *ssrAB* en medio LB.

Nuestros resultados previos indican que la expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat-302+478* se disminuye en una mutante $\Delta slyA$, cuando se crece a *S. Typhimurium* en medio LB (Figura 7). Para confirmar estos resultados, primero se evaluó si la presencia de un plásmido que expresa a SlyA restaura la expresión de la fusión *ssrAB-cat-302+478* en la mutante $\Delta slyA$. Para esto se determinó la expresión de la fusión *ssrAB-cat-302+478* en la cepa *S. Typhimurium* SL1344 silvestre (WT) y en la mutante $\Delta slyA$ transformada con el plásmido pK3-SlyA, el cual expresa constitutivamente a SlyA, o con el vector vacío pMPM-K3.

Como se puede observar en la figura 10A, no se detectó expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat-302+478* en la cepa $\Delta slyA$ conteniendo el vector vacío; en contraste, la presencia del plásmido pK3-SlyA indujo la expresión de esta fusión incluso a un nivel mayor que su expresión en la cepa silvestre (WT). Posteriormente, se confirmó mediante Western-blot la expresión de la proteína SsrA, codificada en el operón *ssrAB*, en la cepa silvestre y en la mutante $\Delta slyA$ con el plásmido pK3-SlyA o con el vector vacío pMPM-K3. Para esto se usaron cepas que expresan SsrA con el epítipo 3XFLAG en su C-terminal (SsrA-FLAG).

Como se muestra en la figura 10B, se detectó la expresión de SsrA-FLAG en la cepa silvestre pero no en la cepa $\Delta slyA$ con el vector vacío; la presencia del plásmido pK3-SlyA indujo la expresión de SsrA-FLAG en la cepa mutante $\Delta slyA$, incluso a un nivel mayor que en la en la cepa silvestre (WT).

Estos resultados indican que el regulador SlyA es necesario para la expresión del operón *ssrAB* cuando se crece a *S. Typhimurium* en medio LB.

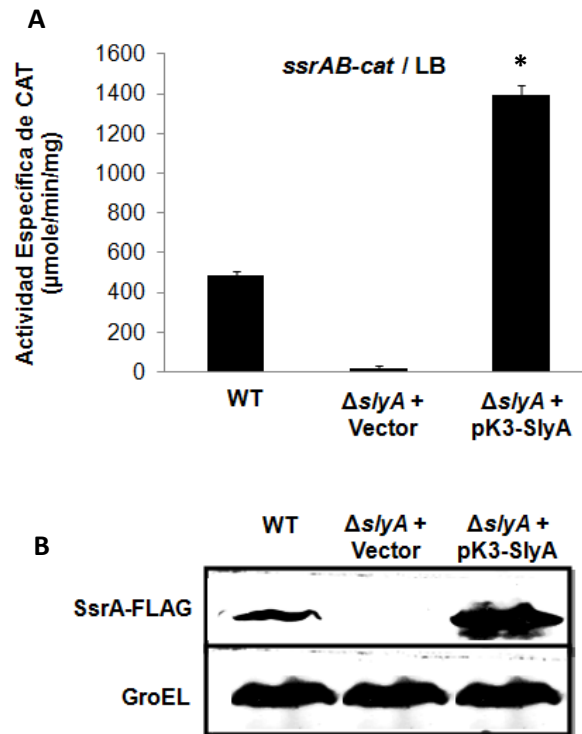


Fig. 10.- SlyA regula positivamente la expresión del operón *ssrAB* en medio LB. Expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat-302+478*, presente en el plásmido p*ssrAB-cat-302+478* (A), o de la proteína SsrA-FLAG (B), en la cepa *S. Typhimurium* SL1344 silvestre (WT) y en su derivada mutante $\Delta slyA$ transformada con el vector vacío pMPPM-K3 o con el plásmido pK3-SlyA que expresa constitutivamente SlyA. La actividad de CAT de la fusión *ssrAB-cat-302+478* y la expresión de la proteína SsrA-FLAG se obtuvo de muestras de cultivos de las bacterias crecidos 9 horas en medio LB. Los datos de actividad específica de CAT son el promedio de tres diferentes experimentos realizados por duplicado. * Indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa $\Delta slyA$ transformada con el vector vacío pMPPM-K3, con un valor de $P < 0.005$. La proteína SsrA-FLAG se detectó mediante Western-blot, usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control de carga, se detectó a la proteína GroEL usando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

VI.2. **SlyA actúa como un anti-represor de H-NS en la expresión del operón *ssrAB*.**

Nuestros antecedentes indican que SlyA no se requiere para la expresión de la fusión *ssrAB-cat-302+10*, la cual no contiene los sitios de unión de H-NS para la represión de *ssrAB* (Figura 7). Esto podría sugerir que SlyA induce la expresión del operón *ssrAB* contrarrestando la represión mediada por H-NS.

Para definir si SlyA actúa como anti-represor de H-NS en el operón *ssrAB*, se analizó la expresión de la proteína SsrA-FLAG en la mutante $\Delta slyA$, inactivando o no a H-NS. La inactivación de H-NS se realizó mediante experimentos de dominancia negativa, en los cuales se sobre-expresa una proteína mutante de H-NS que no se une al DNA pero sí interacciona con la proteína H-NS silvestre (H-NS forma dímeros). Así, la sobre-expresión de la proteína H-NS mutante atrapa a la proteína H-NS silvestre, formando complejos que no se unen al DNA y que por lo tanto no reprimen la expresión de los genes blanco de H-NS. Como dominante negativa, en estos experimentos se usó a la proteína H-NS G113D, la cual tiene una mutación puntual que afecta su unión al DNA. La proteína H-NS G113D y la proteína H-NS WT la cual se usó como control, se sobre-expresaron a partir de los plásmidos pT6-HNS-G113D y pT6-HNS-WT respectivamente, a partir de un promotor inducible con arabinosa.

Como se muestra en la figura 11, la expresión de SsrA-FLAG se detectó en la cepa WT pero no en la mutante $\Delta slyA$ conteniendo o no el vector vacío pMPM-T6, el plásmido pT6-HNS-WT en presencia o no de arabinosa, y de igual manera con el plásmido pT6-HNS-G113D en ausencia de arabinosa. Sin embargo, en la mutante $\Delta slyA$ conteniendo el plásmido pT6-HNS-G113D y en presencia de arabinosa que induce la sobre-expresión de H-NS G113D, la expresión de SsrA-FLAG se restauró en esta cepa a un nivel similar a la cepa WT.

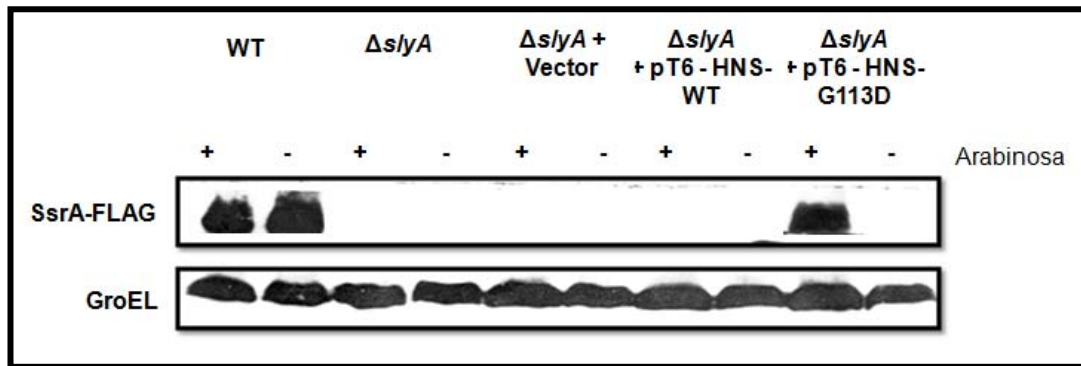


Fig. 11.- Se requiere de SlyA para la expresión del operón *ssrAB* sólo en presencia de la actividad de H-NS. La expresión de SsrA-FLAG se detectó por Western-blot en las cepas *S. Typhimurium* SL1344 (WT) y en su derivada mutante $\Delta slyA$ con el vector vacío pMPM-T6 ó con los plásmidos pT6-HNS-WT y pT6-HNS-G113D. Se indujo la expresión de la proteínas HNS-WT y HNS-G113D con 0.1% de L-arabinosa (+); sin inducir (-). Las muestras fueron tomadas en cultivos crecidos 9 horas en medio LB a 37°C. La proteína SsrA-FLAG se detectó mediante Western-blot, usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control de carga, se detectó a la proteína GroEL usando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

Los resultados anteriores indican que al inhibir a H-NS, la expresión de SsrA se vuelve independiente de SlyA. Para corroborar estos resultados y determinar si se observa el mismo fenómeno a nivel transcripcional, se hizo el mismo análisis evaluando la expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat-302+478*, la cual contiene todos los elementos de regulación del operón *ssrAB*, incluyendo los sitios de unión de H-NS. Para esto se determinaron los niveles de expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat-302+478* en la cepa *S. Typhimurium* SL1344 (WT) y en su derivada mutante $\Delta slyA$ con el vector vacío pMPM-T6 y con los plásmidos pT6-HNS-WT o pT6-HNS-G113D.

Como se puede observar en la figura 12, los niveles de expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat-302+478* disminuyen en la cepa $\Delta slyA$ conteniendo el vector vacío o el plásmido que expresa H-NS silvestre (pT6-HNS-WT), a comparación con la cepa WT; en contraste, en la cepa $\Delta slyA$ que contiene el plásmido que expresa a H-NS G113D (pT6-HNS-G113D) en presencia de arabinosa que induce la sobre-expresión de H-NS G113D, se observa un

incremento en los niveles de expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat-302+478*.

En conjunto, estos resultados indican que al momento de inhibir a H-NS e impidiendo su efecto de represión, la expresión de *ssrAB* se vuelve independiente de SlyA, por lo tanto estos resultados interesantemente nos indican que SlyA está actuando como un anti-represor de H-NS en este operón.

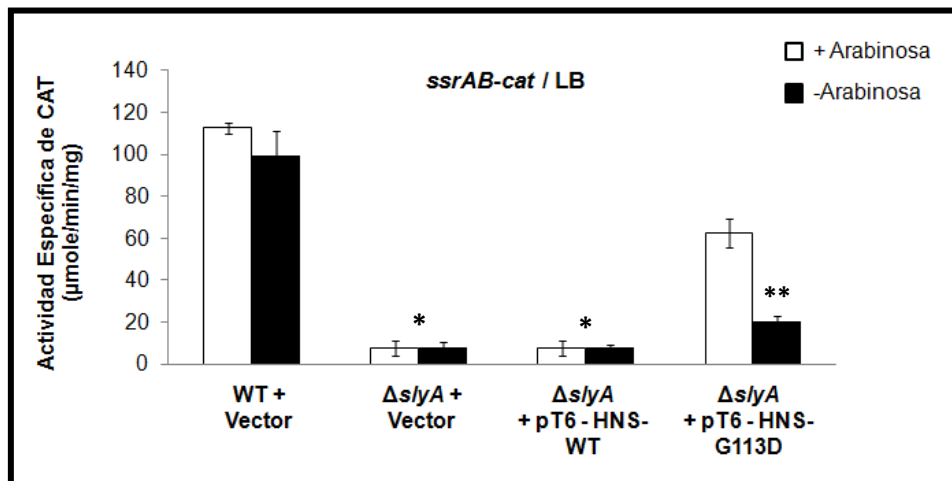


Fig. 12.- SlyA actúa como un anti-represor de H-NS en la expresión del operón *ssrAB*. Se determinaron los niveles de expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat-302+478*, la cual se encuentra en el plásmido *pssrAB-cat-302+478*, en las cepas *S. Typhimurium* SL1344 (WT) y en su derivada mutante *ΔslyA*, conteniendo el vector vacío pMPM-T6 ó los plásmidos pT6-HNS-WT y pT6-HNS-G113D. Los plásmidos pT6-HNS-WT y pT6-HNS-G113D expresan a H-NS WT y la dominante negativa H-NS G113D respectivamente, bajo un promotor inducible con arabinosa. La actividad específica de CAT se obtuvo de muestras de cultivos de las bacterias crecidos 9 horas en medio LB. * Indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa WT + Vector, con un valor de $P < 0.005$. ** Indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa *ΔslyA* conteniendo el plásmido pT6-HNS-G113D en condiciones inductoras, con un valor de $P < 0.05$. La expresión de la proteínas HNS-WT o HNS-G113D se indujo con 0.1% de L-arabinosa (+); sin inducir (-).

VI.3. SlyA desplaza a H-NS de la región reguladora de *ssrAB*.

Previamente, en nuestro grupo se demostró que HilD desplaza a H-NS de la región reguladora del operón *ssrAB* (Martínez *et al.*, 2014). Esto se determinó mediante ensayos de retardamiento en gel (EMSAs) competitivos en los que se puso primero a interaccionar a H-NS con la región reguladora del operón *ssrAB* y posteriormente se agregaron concentraciones crecientes de la proteína HilD. En estos ensayos se observó que conforme aumenta la concentración de HilD va desapareciendo H-NS de la región reguladora del operón *ssrAB*.

Con base en estos resultados, nos planteamos evaluar si SlyA también es capaz de desplazar a H-NS de la región reguladora del operón *ssrAB*. Para esto, primero se trabajó en la purificación de la proteína SlyA.

En trabajos anteriores se ha purificado a la proteína SlyA etiquetándola con el epítotope 6X His en el N-terminal, sin afectar su funcionalidad (Okada *et al.*, 2007; Will *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2003). Así, se seleccionó el vector de clonación pQE30 para obtener a SlyA etiquetada con el epítotope 6X His en su N-terminal. Previo a la clonación del gen *slyA* en el vector de clonación pQE30, en su amplificación por PCR, al gen se le añadió en su extremo N-terminal la secuencia que codifica para el epítotope HA, con el fin de poder detectar a la proteína mediante experimentos de Western-blot

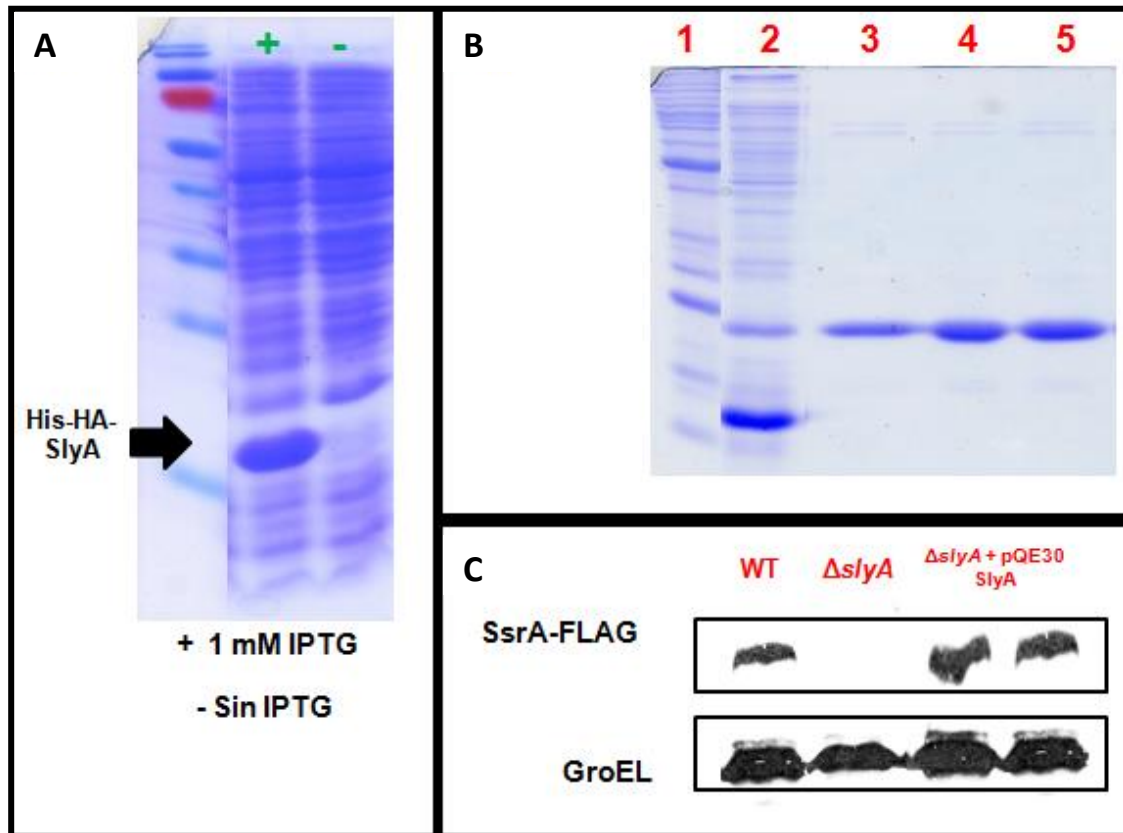


Fig. 13.- Purificación y caracterización de la proteína His-HA-SlyA. (A) Extractos totales de la cepa M15 (pREP4) sobre-expresando la proteína His-HA-SlyA. La flecha negra indica el tamaño esperado de la proteína His-HA-SlyA. Se indujo la expresión de la proteína (+) con 1mM de IPTG. (B) Purificación de la proteína His-HA-SlyA por columna de afinidad a níquel (Ni^{2+}). Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Extracto de proteínas solubles totales. Carril 3-5: Diferentes fracciones de la proteína His-HA-SlyA purificada. (C) Expresión de SsrA-FLAG en las cepas *S. Typhimurium* SL1344 silvestre (WT) y complementando en el fondo genético $\Delta slyA$ SsrA-FLAG con el plásmido pQE30-SlyA. Las muestras fueron tomadas en cultivos crecidos 9 horas en medio LB a 37°C. La proteína SsrA-FLAG se detectó mediante Western-blot, usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control de carga, se detectó a la proteína GroEL usando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

La síntesis de la proteína His-HA-SlyA a partir de su expresión en el plásmido pQE30 se detectó claramente en extractos celulares de la cepa M15 (pREP4), lo cual indica que la proteína His-HA-SlyA se sobre-expresa (Figura 13A). Asimismo, la proteína His-HA-SlyA se purificó con alto grado de pureza a partir de dichos

extractos, mediante cromatografía de afinidad usando una columna de níquel (Ni^{2+}) (Figura 13B). La proteína His-HA-SlyA, la cual tiene un tamaño de 18.569 kDa, se purificó con una concentración molar de 16.44 μM .

Para determinar si la proteína His-HA-SlyA es funcional, lo primero que se determinó fue su capacidad de restaurar la expresión de SsrA-FLAG en la mutante ΔslyA . Como se puede observar en la figura 13C, la presencia del plásmido pQE30-SlyA restauró la expresión de la proteína SsrA-FLAG en la mutante ΔslyA , indicando que la proteína His-HA-SlyA es funcional *in vivo*.

Además, se evaluó si la proteína His-HA-SlyA se une de manera específica el DNA. Para esto se realizaron EMSAs con la proteína His-HA-SlyA purificada y fragmentos de DNA que contienen la región reguladora de *ssrAB* o *ugtL*, como controles positivos, ya que se sabe que SlyA interacciona con estos genes (Okada *et al.*, 2007; Perez *et al.*, 2008). Como control negativo, en todas las reacciones de unión se incluyó la región reguladora del gen *sigD*, el cual no se regula directamente por SlyA.

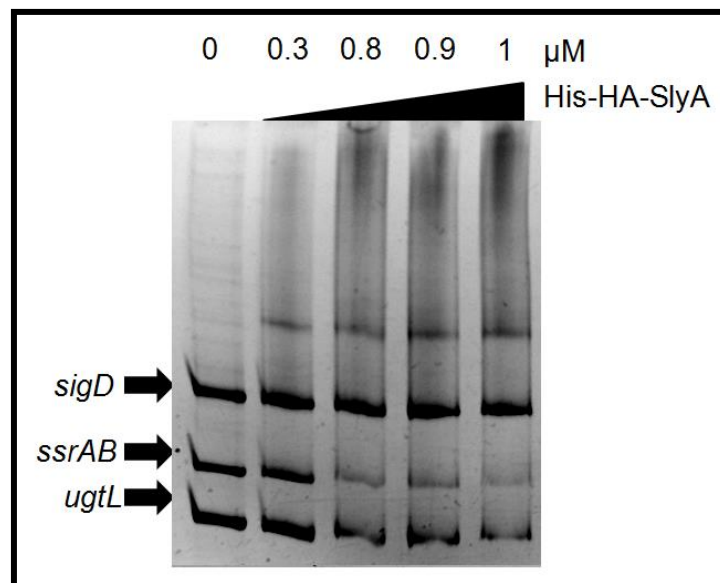


Fig. 14.- La proteína His-HA-SlyA se une de manera específica a las regiones reguladoras de *ssrAB* y *ugtL*. Experimentos de retardamiento en gel (EMSAs) fueron realizados con la región reguladora del gen *ssrAB* y *ugtL* como controles positivos, ya que se ha reportado que SlyA se une a la región reguladora de estos genes y *sigD* como control negativo, ya que su expresión no se ve afectada por SlyA. Esto se hizo con concentraciones crecientes de la proteína His-HA-SlyA (0,

0.3, 0.8, 0.9 y 1 μM). Los complejos DNA-proteína fueron analizados en gels de poliacrilamida al 6%, teñidos con bromuro de etidio.

Como se puede observar en la figura 14, la disminución de la concentración de DNA indica que la proteína His-HA-SlyA interaccionó con la región reguladora de *ssrAB* y *ugtL* pero no con el control negativo *sigD*, indicando que la proteína His-HA-SlyA se une de manera específica al DNA.

Para determinar si SlyA desplaza a H-NS de la región reguladora del operón *ssrAB* se realizaron EMSAs competitivos, en los cuales se puso primero a interaccionar a la proteína H-NS con la región reguladora del operón *ssrAB* y posteriormente se agregaron concentraciones crecientes de la proteína SlyA.

Al incrementar la concentración de His-HA-SlyA se observó una modificación del complejo formado por H-NS-FH (Figura 15), lo cual podría sugerir que la unión de SlyA puede desplazar a H-NS de *ssrAB*. Para confirmar esto, se evaluó la presencia de H-NS-FH en los complejos DNA-proteína de estos ensayos mediante Western-blot usando anticuerpos anti-FLAG. Como se observa en la figura 15, al incrementarse la concentración de His-HA-SlyA se va desapareciendo la presencia de H-NS-FH en estos complejos. También se intentó detectar a His-HA-SlyA en los complejos DNA-proteína usando anticuerpos anti-HA; sin embargo, no logramos observar su detección.

Estos resultados muestran que SlyA actúa como anti-represor de H-NS desplazándolo de la región reguladora del operón *ssrAB*

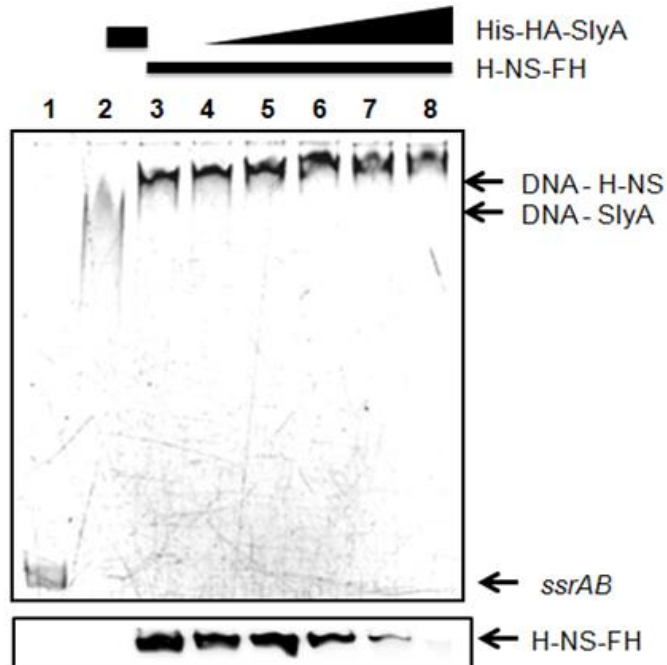


Fig. 15. SlyA desplaza a H-NS de la región reguladora del operón *ssrAB*. El recuadro de arriba es el gel del EMSA competitivo teñido con bromuro de etidio y el de abajo es el Western-blot detectando a la proteína H-NS-FH. Se puso H-NS a una concentración constante de 0.5 μM (Carriles 3 -8) y se añadió la proteína His-HA-SlyA a concentraciones crecientes de 0.7, 1, 2, 2.5 y 3 μM (Carriles 4 - 8, respectivamente). No se añadió proteína en el Carril 1 y se añadió 0.9 μM de la proteína His-HA-SlyA en el Carril 2.

VI.4. SlyA y HilD contrarrestan la represión que ejerce H-NS en el operón *ssrAB*.

Recientemente se determinó que HilD actúa como un anti-represor de H-NS para la expresión del operón *ssrAB* (Martínez *et al.*, 2014). Por otro lado, nuestros resultados indican que SlyA también está actuando como anti-represor de H-NS para la expresión del operón *ssrAB* (Figura 11, 12 y 15). Así, evaluamos si la expresión de *ssrAB* se puede volver independiente de ambos HilD y SlyA al inactivarse a H-NS. Para esto se generó la cepa doble mutante $\Delta\text{hilD } \Delta\text{slyA}$,

donde se determinó el efecto de la inactivación de H-NS en la expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat-302+478*, mediante experimentos de dominancia negativa, utilizando el vector vacío pMPM-T6 y los plásmidos pT6-HNS-WT y pT6-HNS-G113D.

Como se puede observar en la figura 16, la fusión *ssrAB-cat-302+478* mostró un nivel de expresión muy bajo en la mutante $\Delta hilD \Delta slyA$ conteniendo el vector vacío o el plásmido que expresa H-NS silvestre (pT6-HNS-WT), a comparación con la cepa WT. En contraste, en la cepa $\Delta hilD \Delta slyA$ al momento de inducir con arabinosa la expresión de H-NS G113D, a partir del plásmido pT6-HNS-G113D, los niveles de expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat-302+478* incrementaron a niveles similares a los observados en la cepa WT (Figura 16).

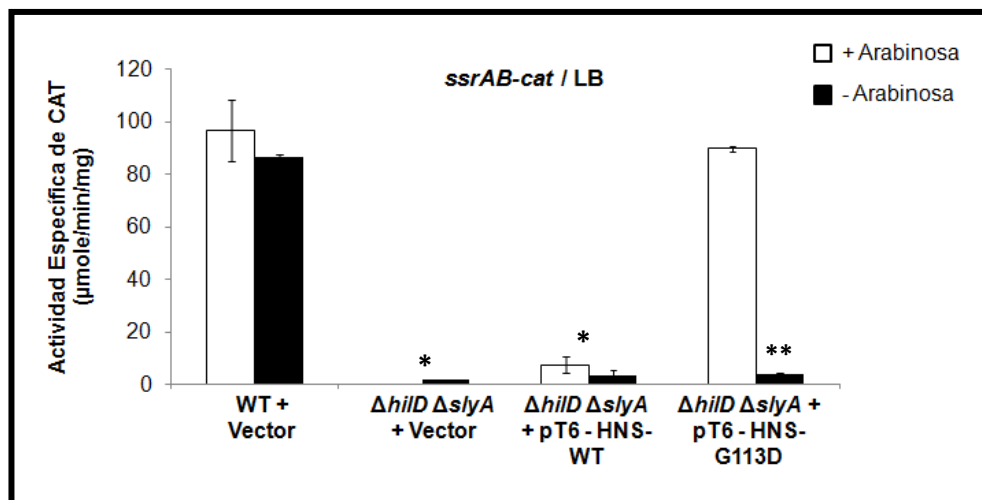


Fig. 16.- SlyA y HilD antagonizan la represión ejercida por H-NS en el operón *ssrAB*. Se determinaron los niveles de expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat-302+478*, la cual se encuentra en el plásmido pssrAB-cat-302+478, en las cepas *S. Typhimurium* SL1344 (WT) y en su derivada mutante $\Delta hilD \Delta slyA$, las cuales contienen el vector vacío pMPM-T6 o los plásmidos pT6-HNS-WT y pT6-HNS-G113D. Los plásmidos pT6-HNS-WT y pT6-HNS-G113D expresan a H-NS WT y la dominante negativa H-NS G113D respectivamente, bajo un promotor inducible con arabinosa. La actividad específica de CAT se obtuvo de muestras de cultivos de las bacterias crecidos 9 horas en medio LB. * Indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa WT + Vector, con un valor de $P < 0.005$. ** Indica una diferencia estadísticamente significativa

con respecto a la cepa *ΔhilD ΔslyA* conteniendo el plásmido pT6-HNS-G113D en condiciones inductoras, con un valor de $P < 0.0005$. La expresión de la proteínas HNS-WT o HNS-G113D se indujo con 0.1% de L-arabinosa (+); sin inducir (-).

De la misma manera, se evaluó el efecto de la inactivación de H-NS en la expresión de SsrA-FLAG en la cepa *ΔhilD ΔslyA* mediante Western-blot.

Como se puede observar en la figura 17, la expresión de SsrA-FLAG no se detectó en la cepa mutante *ΔhilD ΔslyA* con o sin el vector vacío o el plásmido pT6-HNS-WT, en presencia o no de arabinosa; así como en la mutante *ΔhilD ΔslyA* conteniendo el plásmido pT6-HNS-G113D no se observó la expresión de SsrA-FLAG en ausencia de arabinosa. En contraste, en presencia de arabinosa que induce la sobre-expresión de H-NS G113D, la expresión de SsrA-FLAG se restauró en esta cepa a un nivel similar al de su expresión en la cepa WT.

En conjunto, estos datos indican que al momento de inactivar H-NS ya no se requiere de SlyA y de HilD para la expresión del operón *ssrAB*. Por lo tanto, ambos reguladores, SlyA y HilD, actúan como anti-represores de H-NS en la expresión del operón *ssrAB*.

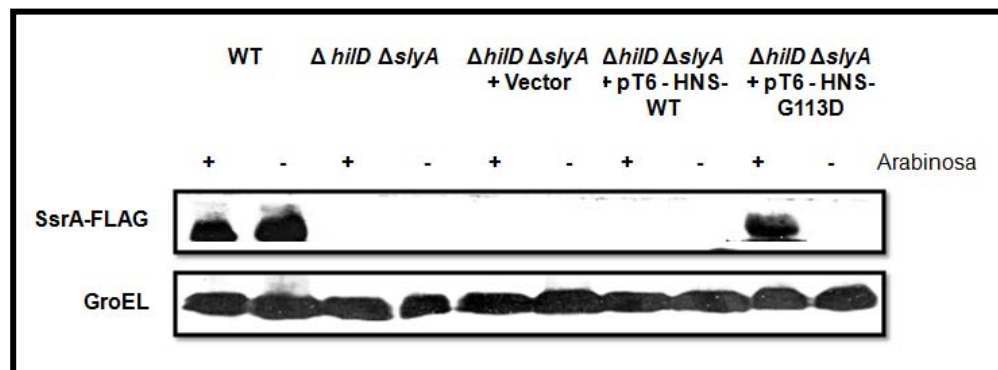


Fig. 17.- SsrA-FLAG se detecta en la cepa *ΔhilD ΔslyA* al momento de inhibir al represor H-NS. La expresión de SsrA-FLAG se detectó por Western-blot en las cepas *S. Typhimurium* SL1344 (WT) y en su derivada mutante *ΔhilD ΔslyA* con el vector vacío pMPM-T6 ó con los plásmidos pT6-HNS-WT y pT6-HNS-G113D. Se indujo la expresión de la proteínas HNS-WT y HNS-G113D con 0.1% de L-arabinosa (+); sin inducir (-). Las muestras fueron tomadas en cultivos crecidos 9 horas en medio LB a 37°C. La proteína SsrA-FLAG se detectó mediante Western-blot, usando

anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control de carga, se detectó a la proteína GroEL usando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

VI.4.1. La expresión del operón *ssrAB* requiere de la acción conjunta de SlyA y HilD, los cuales actúan como anti-represores de H-NS, y de OmpR que actúa como un activador clásico.

Resultados previos de nuestro grupo y los resultados obtenidos en este trabajo indican que SlyA y HilD actúan como un anti-represores de H-NS para la expresión del operón *ssrAB* (Figura 11, 12, 15, 16 y 17). A su vez, también se requiere de OmpR, el cual es el regulador de respuesta del sistema de dos componentes EnvZ/OmpR (Lee *et al.*, 2012). Con base en esto, pensamos en un modelo de regulación de la expresión de *ssrAB*, donde SlyA y HilD actúan como antagonistas de H-NS y OmpR como un activador clásico para inducir la expresión de este operón. Para confirmar esto se realizaron los experimentos que se describen a continuación.

En primer lugar se determinó la expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat-302+478*, la cual contiene los sitios de unión del represor H-NS, y de la fusión *ssrAB-cat-302+10* que no contiene los sitios de unión de H-NS, en la cepa *S. Typhimurium* SL1344 (WT) y en sus derivadas mutantes $\Delta slyA$, $\Delta hilD$, $\Delta ompR$ y $\Delta hilD \Delta slyA$.

Como se puede observar en la figura 18A, de acuerdo a lo esperado la expresión de la fusión *ssrAB-cat-302+478* disminuyó en las mutantes $\Delta slyA$ y $\Delta hilD$; sin embargo, la disminución fue más drástica en las mutantes $\Delta hilD \Delta slyA$ y $\Delta ompR$. Estos datos indican que para la expresión del operón *ssrAB* en medio LB se requiere de los tres reguladores: SlyA, HilD y OmpR. Además, se muestra un efecto aditivo de SlyA y HilD en la expresión del operón *ssrAB*

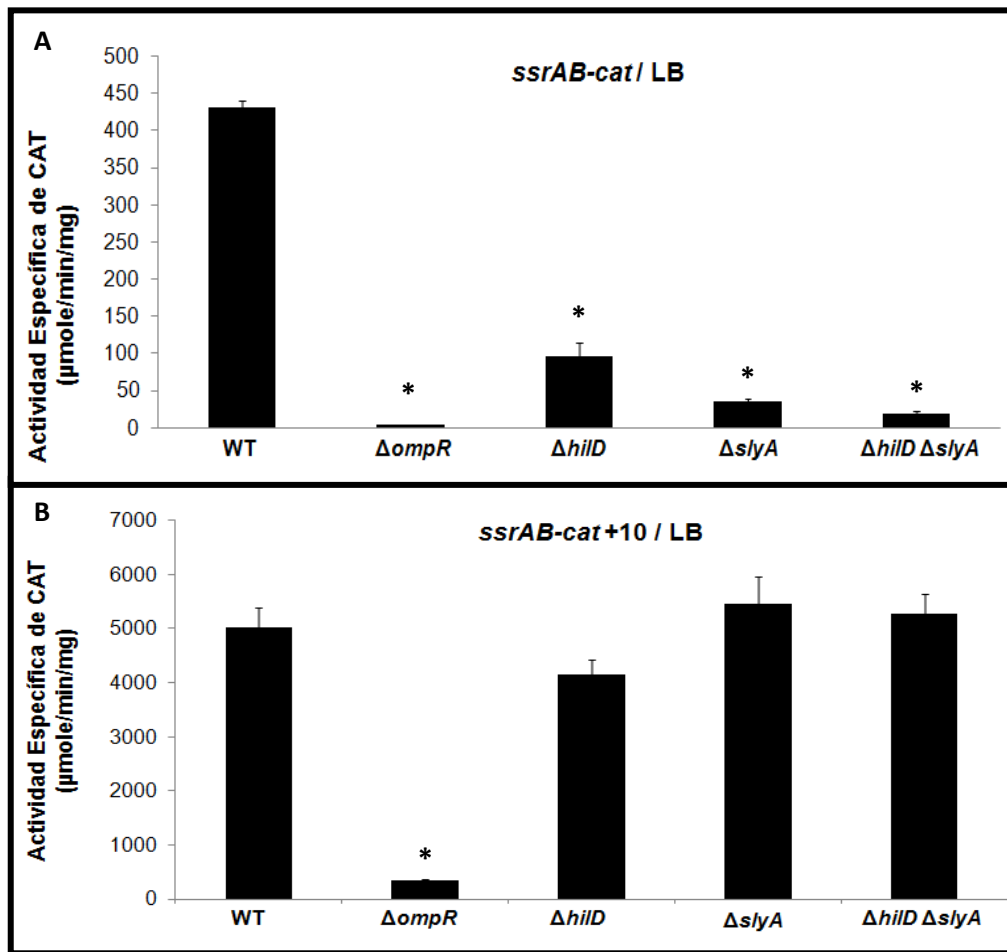


Fig. 18.- Regulación del operón *ssrAB* por Hild, SlyA y OmpR. Los niveles de expresión de las fusiones transcripcionales *ssrAB-cat-302+478* (A) y *ssrAB-cat+10* (B), contenidas en los plásmidos *pssrAB-cat-302+478* y *pssrAB-cat+10* respectivamente, se determinaron en las cepas *S. Typhimurium* SL1344 (WT) y en sus derivadas mutantes $\Delta ompR$, $\Delta hild$, $\Delta slyA$ y $\Delta hild \Delta slyA$. La fusión *ssrAB-cat-302+478* contiene todos los elementos de regulación de *ssrAB*, incluyendo la represión por H-NS, mientras que la fusión *ssrAB-cat+10* carece de la región necesaria para la represión de *ssrAB* por H-NS. La actividad específica de CAT se obtuvo de muestras de cultivos de las bacterias crecidos 9 horas en medio LB. Estos datos son el promedio de tres diferentes experimentos realizados por duplicado. * Indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa WT, con un valor de $P < 0.005$.

Como se puede observar en la figura 18B, la expresión de la fusión *ssrAB-cat-302+10* no se afectó en las cepas $\Delta slyA$ y $\Delta hild$, ni en la doble mutante $\Delta hild \Delta slyA$; en contraste, su expresión disminuyó drásticamente en la mutante $\Delta ompR$.

En segundo lugar, se realizaron experimentos de Western-blot para determinar el efecto de la inactivación de H-NS, mediante experimentos de dominancia negativa, en la expresión de la proteína SsrA-FLAG en las mutantes $\Delta ompR$ y $\Delta hilD$.

Como se muestra en la figura 19, la expresión de SsrA-FLAG se detectó en la cepa WT pero no en las mutantes $\Delta ompR$ y $\Delta hilD$ conteniendo o no el vector vacío o el plásmido pT6-HNS-WT; asimismo, en las mutantes $\Delta ompR$ y $\Delta hilD$ conteniendo el plásmido pT6-HNS-G113D no se observó la expresión de SsrA-FLAG en ausencia de arabinosa. En contraste, en presencia del plásmido pT6-HNS-G113D y de arabinosa que induce la sobre-expresión de H-NS G113D, la expresión de SsrA-FLAG se restauró en la mutante $\Delta hilD$, pero no en la mutante $\Delta ompR$ (Figura 19).

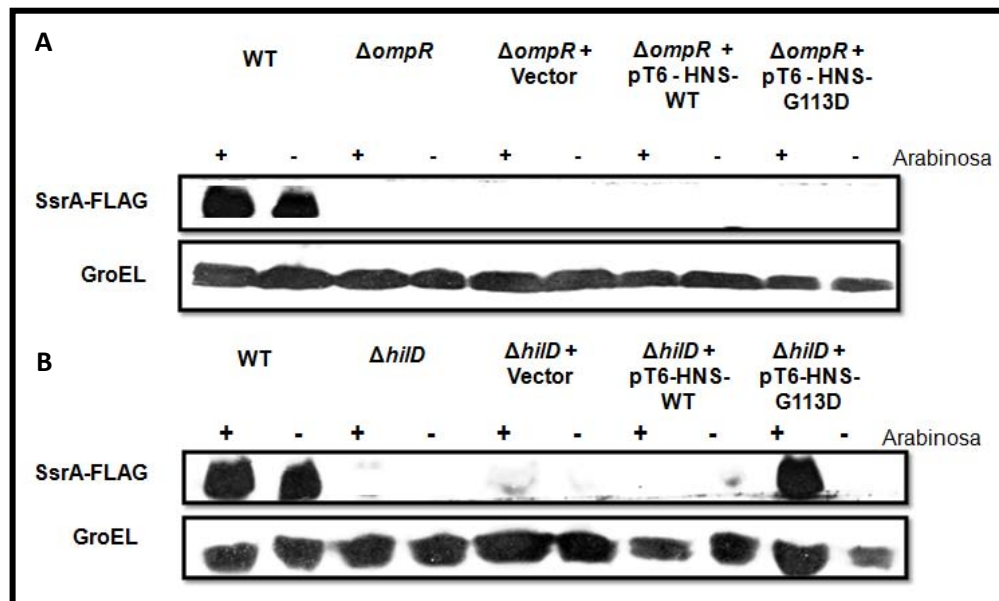


Fig. 19.- *OmpR* se requiere para la expresión de *ssrAB* aún en la ausencia de la actividad de H-NS. La expresión de SsrA-FLAG se detectó por Western-blot en las cepas *S. Typhimurium* SL1344 (WT) y en sus derivadas mutantes $\Delta ompR$ (A) y $\Delta hilD$ (B) con el vector vacío pMPM-T6 o con los plásmidos pT6-HNS-WT y pT6-HNS-G113D. Se indujo la expresión de la proteínas HNS-WT y HNS-G113D con 0.1% de L-arabinosa (+); sin inducir (-). Las muestras fueron tomadas en cultivos crecidos 9 horas en medio LB a 37°C. La proteína SsrA-FLAG se detectó

mediante Western-blot, usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control de carga, se detectó a la proteína GroEL usando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

Estos resultados indican que para la expresión del operón *ssrAB* se requiere de la acción cooperativa de SlyA y HilD, los cuales actúan como antagonistas de H-NS, y de OmpR que se requiere aún en ausencia de la represión mediada por H-NS, sugiriendo que éste actúa como activador transcripcional clásico.

VI.5. Se requiere del regulador SlyA para la expresión del operón *ssrAB* en MM-N y actúa como anti-represor de H-NS.

Estudios previos indican que se requiere del regulador SlyA para la expresión del operón *ssrAB* cuando se crece a *Salmonella* en medios mínimos (Feng *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2000; Will *et al.*, 2014). Sin embargo, no se ha determinado de qué manera SlyA induce la expresión de *ssrAB* en estas condiciones de crecimiento. Para investigar esto, primero se confirmó si SlyA regula positivamente a *ssrAB* cuando se crece a *Salmonella* en medios mínimos. Para esto se determinó la expresión de la fusión *ssrAB-cat-302+478* en la cepa *S. Typhimurium* SL1344 WT y en su derivada mutante Δ *slyA* transformada con el plásmido pK3-SlyA, el cual expresa constitutivamente a SlyA, o con el vector vacío pMPM-K3, creciendo a las cepas en MM-N. Como se puede observar en la figura 20A, los niveles de expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat-302+478* en la mutante Δ *slyA* conteniendo el vector vacío son casi nulos; en contraste, la presencia del plásmido pK3-SlyA incrementó la expresión de esta fusión, alcanzando un nivel de expresión mayor que el mostrado en la cepa WT.

Posteriormente, se evaluó la expresión de la proteína SsrA, codificada en el operón *ssrAB*, en la cepa WT y en la mutante Δ *slyA* transformada con el plásmido pK3-SlyA o con el vector vacío pMPM-K3. Para esto se usaron cepas que expresan la proteína SsrA-FLAG.

Como se muestra en la figura 20B, se detectó la expresión de la proteína SsrA-FLAG en la cepa WT pero no en la cepa Δ *slyA* con el vector vacío; en contraste, la presencia del plásmido pK3-SlyA incrementó la expresión de SsrA-FLAG en la

cepa mutante $\Delta slyA$, alcanzando un nivel de expresión mayor que el mostrado en la cepa WT.

Estos resultados indican que efectivamente se requiere del regulador SlyA para la expresión del operón *ssrAB* cuando se crece a *S. Typhimurium* en medios mínimos.

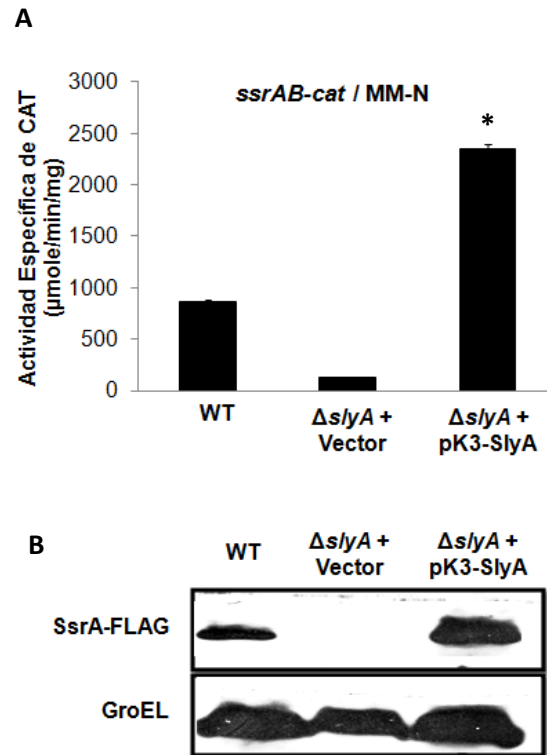


Fig. 20.- Se requiere de SlyA para la expresión del operón *ssrAB* en MM-N. Expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat-302+478*, presente en el plásmido *pssrAB-cat-302+478* (A), o de la proteína SsrA-FLAG (B), en la cepa *S. Typhimurium* SL1344 (WT) y en su derivada mutante $\Delta slyA$ transformada con el vector vacío pMPPM-K3 o con el plásmido pK3-SlyA que expresa constitutivamente SlyA. La actividad de CAT de la fusión *ssrAB-cat-302+478* y la expresión de la proteína SsrA-FLAG se obtuvo de muestras de cultivos de las bacterias crecidas 16 horas en MM-N a 37°C. Los datos de actividad específica de CAT es el promedio de tres diferentes experimentos realizados por duplicado. * Indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa $\Delta slyA$ transformada con el vector vacío pMPPM-K3, con un valor de $P < 0.005$. La proteína SsrA-FLAG se detectó mediante Western-blot, usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control de carga, se detectó a la proteína GroEL usando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

Nuestros resultados indican que SlyA contrarresta la represión que ejerce H-NS para la expresión del operón *ssrAB* cuando se crece a *Salmonella* en LB, por lo que pensamos que SlyA podría actuar de manera similar en medios mínimos.

Para evaluar esto, se determinó la expresión de la fusión *ssrAB-cat-302+478* y la proteína SsrA-FLAG en la cepa *S. Typhimurium* SL1344 WT y en su derivada mutante Δ *slyA* transformada con el vector vacío pMPM-T6 ó con los plásmidos pT6-HNS-WT y pT6-HNS-G113D.

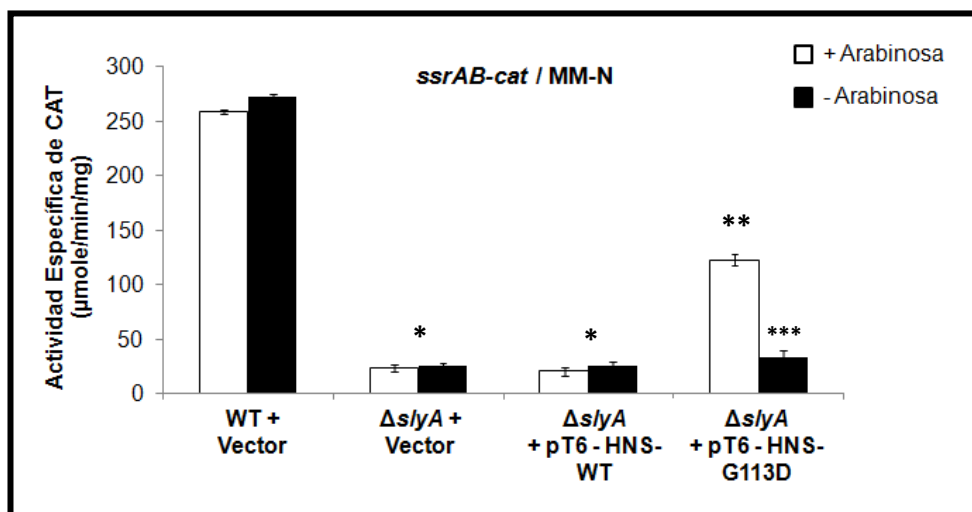


Fig. 21.- SlyA actúa como un anti-represor de H-NS para la expresión del operón *ssrAB* en MM-N. Se determinó los niveles de expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat-302+478*, la cual se encuentra en el plásmido *pssrAB-cat-302+478*, en la cepas *S. Typhimurium* SL1344 (WT) y en su derivada mutante Δ *slyA*, las cuales contienen el vector vacío pMPM-T6 o los plásmidos pT6-HNS-WT y pT6-HNS-G113D. Los plásmidos pT6-HNS-WT y pT6-HNS-G113D expresan a H-NS WT y la dominante negativa H-NS G113D respectivamente, bajo un promotor inducible con arabinosa. La actividad específica de CAT se obtuvo de muestras de cultivos de las bacterias crecidas 16 horas en MM-N a 37°C. * Indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa WT + Vector, con un valor de $P < 0.005$. ** Indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa WT + Vector, con un valor de $P < 0.05$. *** Indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa Δ *slyA* conteniendo el plásmido pT6-HNS-G113D en condiciones inductoras, con un valor de $P < 0.005$. La expresión de la proteínas HNS-WT o HNS-G113D se indujo con 0.1% de L-arabinosa (+); sin inducir (-).

Como se puede observar en la figura 21, la expresión de la fusión *ssrAB-cat-302+478* disminuyó en la cepa $\Delta slyA$ conteniendo el vector vacío o el plásmido que expresa H-NS silvestre (pT6-HNS-WT), en presencia o no de arabinosa, con respecto a su nivel de expresión en la cepa WT. En contraste, en la cepa $\Delta slyA$ conteniendo el plásmido pT6-HNS-G113D y la presencia de arabinosa que induce la sobre-expresión de H-NS G113D, incrementó la actividad de la fusión *ssrAB-cat-302+478* (Figura 21). Resultados similares se obtuvieron al analizar la expresión de la proteína SsrA-FLAG (Figura 22).

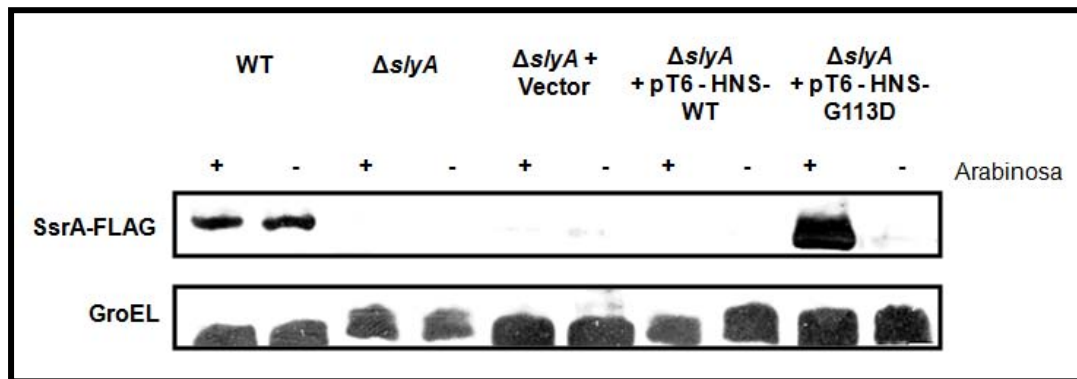


Fig. 22.- SlyA actúa como un anti-represor de H-NS para la expresión de SsrA en MM-N. La expresión de SsrA-FLAG se detectó por Western-blot en la cepas *S. Typhimurium* SL1344 (WT) y en su derivada mutante $\Delta slyA$ con los vectores pMPPM-T6, pT6-HNS-WT o pT6-HNS-G113D. Se indujo la expresión de la proteínas HNS-WT y HNS-G113D con 0.1% de L-arabinosa (+); sin inducir (-). Las muestras fueron tomadas en cultivos crecidos 16 horas en MM-N a 37°C. La proteína SsrA-FLAG se detectó mediante Western-blot, usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control de carga se detectó a la proteína GroEL usando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

En conjunto, estos resultados indican que SlyA también actúa como un anti-represor de H-NS para la expresión del operón *ssrAB* cuando se crece a *Salmonella* en MM-N.

VI.6. Circuito de regulación positiva formado por HilD y SlyA.

En nuestros resultados se observa que hay un efecto cooperativo entre SlyA y HilD para la expresión del operón *ssrAB* (Figura 18). Con base en esto, se investigó la posibilidad de que SlyA y HilD se regularan el uno al otro. Para esto se determinó la expresión de las fusiones transcripcionales *slyA-cat* y *hilD-cat* en las cepas *S. Typhimurium* SL1344 WT y en sus derivadas mutantes $\Delta slyA$, $\Delta hilD$ y $\Delta hilD \Delta slyA$.

Como se puede observar en la figura 23A, la expresión de la fusión *slyA-cat* disminuyó en las mutantes $\Delta hilD \Delta slyA$ y $\Delta hilD$, pero no en la mutante $\Delta slyA$, con respecto a su nivel de expresión en la cepa WT. Asimismo, la expresión de la fusión *hilD-cat* disminuyó en la mutante $\Delta slyA$ y como esperado, ya que HilD se autoregula positivamente (Dieye *et al.*, 2009; Fàbrega *et al.*, 2013), también disminuyó en las mutantes $\Delta hilD$ y $\Delta hilD \Delta slyA$, con respecto a su nivel de expresión en la cepa WT (Figura 23B).

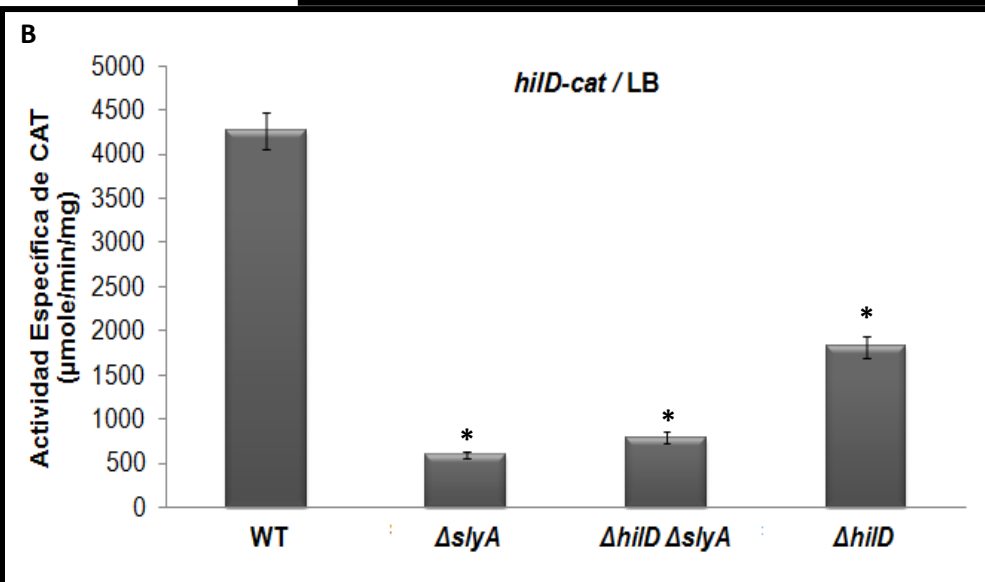
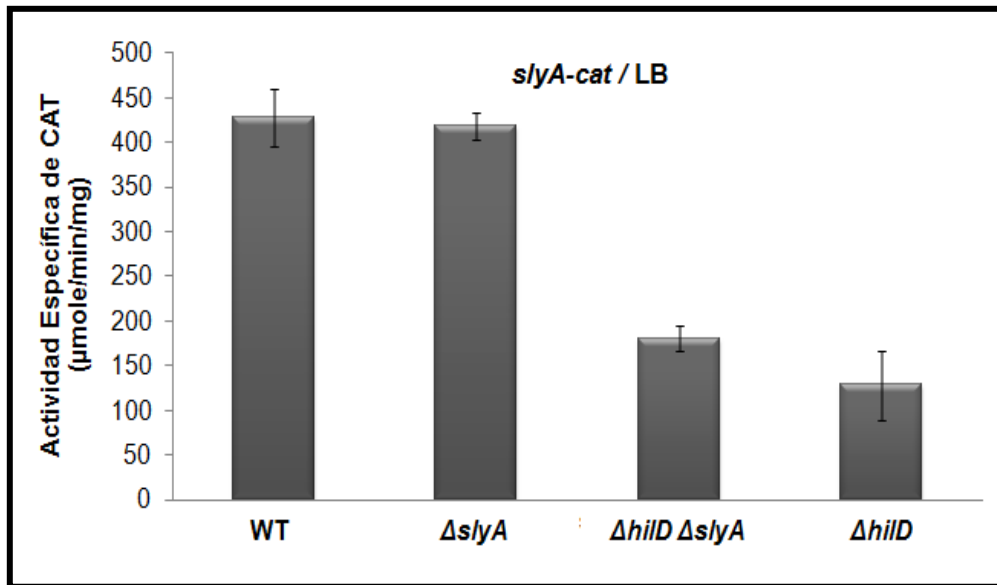


Fig. 23.- SlyA y HilD se regulan positivamente el uno al otro. Los niveles de expresión de las fusiones transcripcionales *slyA-cat* (A) y *hilD-cat* (B), contenidas en los plásmidos *pslyA-cat* y *philD-cat* respectivamente, se determinaron en la cepa *S. Typhimurium* SL1344 silvestre (WT) y en sus derivadas mutantes $\Delta slyA$, $\Delta hilD \Delta slyA$ y $\Delta hilD$. La actividad específica de CAT se obtuvo de muestras de cultivos de las bacterias crecidos 9 horas en medio LB a 37°C. Estos datos son el promedio de tres diferentes experimentos realizados por duplicado. * Indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la cepa WT, con un valor de $P < 0.005$.

Estos resultados son muy interesantes, ya que revelan una regulación positiva recíproca entre SlyA y HilD.

Para definir si HilD regula directa o indirectamente la expresión de *slyA*, se analizó la interacción de la proteína purificada MBP-HilD con la región reguladora de *slyA* contenida en la fusión *slyA-cat*. Como control negativo se usó la región reguladora de *sigD*, ya que es un gen que su expresión es inducida de manera indirecta por HilD; asimismo, como control positivo se usó la región reguladora de *hilA*, el cual es regulado directamente por HilD.

Como se puede observar en la figura 24A, la proteína MBP-HilD interaccionó con la región reguladora de *hilA*, pero no con la de *slyA* o *sigD*. Estos resultados indican que HilD no interacciona con la región reguladora de *slyA*.

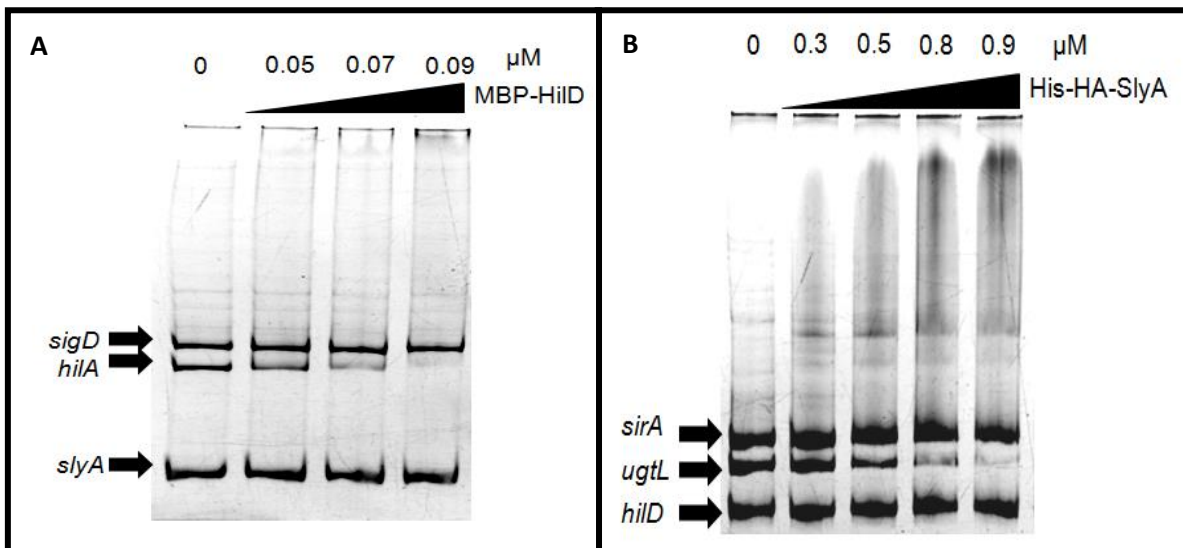


Fig. 24.- SlyA no interacciona con la región reguladora de *hilD* y HilD no interacciona con la región reguladora de *slyA*. (A) EMSAs fueron realizados con la región reguladora del gen *slyA* y con concentraciones crecientes de la proteína MBP-HilD (0, 0.05, 0.07 y 0.09 μM). *sigD* se usó como control negativo, ya que HilD no regula de manera directa su expresión; mientras que *hilA* se usó como control positivo, ya que se ha reportado que HilD se une a la región reguladora de este gen. (B) Se realizaron EMSAs con la región reguladora del gen *hilD* y con concentraciones crecientes de la proteína His-HA-SlyA (0, 0.3, 0.5, 0.8 y 0.9 μM). *sirA* se usó como control negativo, ya que su expresión no se ve afectada por SlyA; mientras que *ugtL* se usó como control positivo, ya que se ha reportado que SlyA se une a la región reguladora

de este gen. Los complejos DNA-proteína fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6%, teñidos con bromuro de etidio.

Para definir si SlyA regula directa o indirectamente la expresión de *hiiD*, se analizó la interacción de la proteína purificada His-HA-SlyA con la región reguladora de *hiiD* contenida en la fusión *hiiD-cat*. Como control negativo se usó la región reguladora de *sirA*, ya que su expresión no se afecta por SlyA; asimismo, como control positivo se usó la región reguladora de *ugtL*, el cual se regula directamente por SlyA.

Como se puede observar en la figura 24B, la proteína His-HA-SlyA interaccionó con la región reguladora de *ugtL*, pero no con la de *hiiD* o *sirA*. Estos resultados muestran que SlyA no interacciona con la región reguladora de *hiiD*.

En conjunto, estos resultados de los EMSAs (Figura 24) y los respectivos de los análisis de expresión (Figura 23), indican que la regulación positiva y recíproca entre SlyA y HiiD es de manera indirecta.

VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El estudio de los mecanismos que regulan la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, los cuales codifican para factores esenciales para la virulencia de *Salmonella*, es muy importante para entender la patogénesis de esta bacteria. Estudios previos de nuestro grupo han hecho importantes contribuciones a este respecto (Bustamante *et al.*, 2008; De la Cruz *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2011)

La principal función de los genes de SPI-2 es permitir que *Salmonella* pueda replicarse y sobrevivir dentro de macrófagos y otras células de sus hospedadores, lo cual lleva al establecimiento de la infección sistémica (Haraga *et al.*, 2008; Knodler *et al.*, 2003; Moest *et al.*, 2013; Srikumar *et al.*, 2015; Yoon *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha determinado que también son importantes para inducir una respuesta inflamatoria intestinal (Coombes *et al.*, 2005; Knodler *et al.*, 2014; Laughlin *et al.*, 2014). Consistente con esto, se ha visto que los genes de SPI-2 se expresan cuando *Salmonella* está dentro de sus células hospederas y también cuando *Salmonella* está en el lumen y en la sub-mucosa intestinal (Brown *et al.*, 2005; Cardenal-Muñoz *et al.*, 2011).

Hay dos condiciones de cultivo que inducen la expresión de genes de virulencia de *Salmonella*: el crecimiento en medios de cultivo rico, como el LB, y el crecimiento en medios mínimos, como el MM-N. Con base en cómo se expresan los genes de SPI-1 y SPI-2 en estas condiciones de cultivo, se considera que el crecimiento en medios ricos en nutrientes mimetiza las señales que se localizan en el lumen intestinal, mientras que el crecimiento en medios mínimos mimetiza las señales que se encuentran intracelularmente, ya sea de macrófagos o de células epiteliales (Bustamante *et al.*, 2008; Kroger *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2000). Los genes de SPI-2 se expresan tanto en LB, en una fase estacionaria tardía de crecimiento, como en MM-N, lo cual podría reflejar su expresión cuando *Salmonella* está en el intestino y cuando está dentro de sus células hospedadoras, respectivamente.

Previamente se había determinado que SlyA controla positivamente la expresión del operón *ssrAB*, y así la expresión de los genes de SPI-2, cuando se crece a *Salmonella* en medios mínimos, (Li *et al.*, 2015; Linehan *et al.*, 2005). Asimismo, se ha reportado que SlyA se une a la región reguladora del operón *ssrAB* (Okada *et al.*, 2007). Consistente con esto, se ha reportado que cepas de *S. Tiphymurium* mutantes nulas de *slyA* están atenuadas en virulencia, ya que se ve afectada su capacidad de sobrevivir y replicarse dentro de macrófagos (Buchmeier *et al.*, 1997; Corbett *et al.*, 2007).

En este trabajo se muestra por primera vez que el regulador SlyA controla positivamente la expresión del operón *ssrAB* cuando se crece a *Salmonella* en LB, en una fase estacionaria tardía de crecimiento (Figura 9). Así, nuestros resultados sugieren que SlyA podría estar involucrado en la expresión de los genes de SPI-2 en el intestino de sus hospedadores.

Nuestros resultados indican que la expresión de *ssrAB* se vuelve independiente de SlyA cuando se inactiva al represor H-NS (Figura 11 y 12). Además, mostramos que SlyA es capaz de desplazar a H-NS de la región reguladora del operón *ssrAB* (Figura 15). En conjunto, estos resultados indican que SlyA actúa como anti-represor de H-NS, desplazándolo de la región regulatoria del operón *ssrAB*. SlyA también actúa como anti-represor de H-NS en otros genes de virulencia, como por ejemplo *pagC* y *ugtL*, los cuales codifican para una proteína de membrana externa necesaria para la resistencia al suero y para una proteína de membrana interna que promueve la formación del lípido A monofosforilado, el cual está implicado en la resistencia a los péptidos antimicrobianos, respectivamente (Perez *et al.*, 2008; Navarre *et al.*, 2005).

Resultados previos de nuestro grupo indican que HilD también antagoniza la represión que ejerce H-NS en la expresión del operón *ssrAB* (Martínez *et al.*, 2014). En este trabajo mostramos que cuando se inactiva a H-NS, ya no se requiere de SlyA y de HilD para la expresión del operón *ssrAB* (Figura 16). Así, nuestros resultados sugieren la existencia de un doble mecanismo de represión por H-NS en *ssrAB*, uno sería contrarrestado por HilD y el otro por SlyA. En apoyo a esto, en este trabajo observamos que hay un efecto aditivo entre SlyA y HilD en

la expresión del operón *ssrAB* (Figura 18A). Se ha reportado que H-NS se une a diferentes sitios en la región reguladora del operón *ssrAB*, lo cual sugiere que la forma en que H-NS reprime la expresión de *ssrAB* es mediante la formación de un filamento nucleoproteínico sobre su promotor (Li *et al.*, 2015; Lim *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2014). HiiD y SlyA podrían desplazar a H-NS de distintos sitios de unión y así, en conjunto, desplazarlo en su totalidad del promotor de *ssrAB*, permitiendo así su expresión y por ende la de los genes de SPI-2. Se ha descrito que H-NS se une a regiones de DNA ricas en A+T, las cuales inducen doblamientos en el DNA, por lo tanto se ha propuesto que H-NS reconoce estructuras en el DNA más que secuencias específicas (Olekhnovich *et al.*, 2007; Dorman *et al.*, 2004). Entonces, la unión de SlyA y HiiD podrían modificar la estructura local de la región reguladora del operón *ssrAB*, lo que favorecería que H-NS se despegue.

Los resultados de este trabajo, así como otros previos de nuestro grupo, muestran que OmpR se requiere para la expresión de *ssrAB*, aún cuando se inactiva a la proteína H-NS; asimismo, se ha demostrado que OmpR interacciona con la región reguladora de *ssrAB* (Garmendia *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2000). Esto apoya fuertemente la hipótesis de que OmpR funciona como un activador clásico en *ssrAB*. Así, con base a los resultados de este estudio y a los antecedentes, nosotros proponemos un modelo para el control de la expresión del operón *ssrAB* por H-NS, SlyA, HiiD y OmpR, el cual se describe a continuación. Se ha reportado que H-NS se expresa de manera constitutiva (Ali *et al.*, 2014; Li *et al.* 2015); así, la expresión de *ssrAB* estará reprimida por la unión de esta proteína a varios sitios en la región reguladora de este operón. Cuando se expresan HiiD y SlyA, estas proteínas se unen a la región reguladora de *ssrAB*, desplazando a H-NS, lo cual permite que OmpR se una a esta región reguladora y favorezca la interacción de la RNA polimerasa con el promotor y así la transcripción de *ssrAB* (Figura 25).

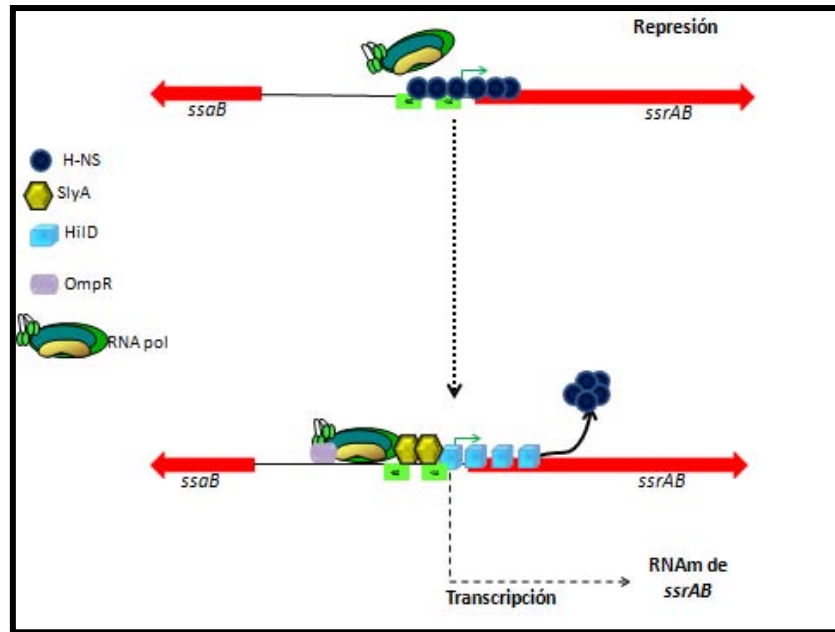


Fig. 25.- Modelo de regulación de la expresión de *ssrAB* por H-NS, HilD, SlyA y OmpR. H-NS ejerce un doble mecanismo de represión en el operón *ssrAB*, uniéndose a varios sitios localizados sobre el promotor y corriente abajo de éste. HilD se une cerca o sobre algunos de estos sitios y así desplaza una parte de las moléculas de H-NS unidas en *ssrAB*, contrarrestando de esta manera uno de los mecanismos de represión por H-NS. SlyA elimina el segundo mecanismo de represión por H-NS, lo que permite la unión de OmpR que favorece la unión de la RNA polimerasa al promotor de *ssrAB* y, por lo tanto la transcripción de este operón.

Hay reportes de modelos de regulación en los que se involucra la acción de un anti-represor de H-NS y de un activador para la expresión de un gen. Por ejemplo, para algunos genes involucrados en virulencia de *Salmonella* como *pagC*, se ha reportado que para su expresión se requiere de la actividad de SlyA, que antagoniza la represión por H-NS, y de PhoP que actúa como activador clásico (Perez *et al.*, 2008). De igual manera para *hilA*, el cual codifica para el regulador maestro involucrado en la expresión de los genes de SPI-1, se ha reportado que para su expresión se requiere de la actividad de HilD, el cual contrarresta la represión por H-NS, y de OmpR que actúa como activador clásico (Lucas *et al.*, 2001). Sin embargo, por lo que sabemos no hay algún reporte de un modelo de

regulación que involucre dos anti-represores de H-NS y un activador clásico, como el que nosotros reportamos en este estudio para la regulación de la expresión del operón *ssrAB* por SlyA, HilD y OmpR.

En este trabajo también demostramos que cuando *Salmonella* se crece en el medio mínimo MM-N, SlyA induce la expresión de los genes de SPI-2 actuando como anti-represor de H-NS (Figura 21 y 22). Se ha reportado que en estas condiciones de crecimiento se requieren también a los reguladores OmpR y PhoP, pero no a HilD, para la expresión de *ssrAB* (Bustamante *et al.*, 2008; Bijlsma *et al.*, 2005; Lathrop *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2000; Linehan *et al.*, 2005). Es probable que en esta condición de crecimiento haya otro regulador que supla la acción de HilD como anti-represor de H-NS para contrarrestar junto con SlyA, la doble represión de H-NS sobre *ssrAB* que se observa cuando *Salmonella* crece en LB. Alternativamente, H-NS podría reprimir diferencialmente a *ssrAB* en LB y MM-N: en LB podría haber una doble vía de represión, la cual requiera la acción de SlyA y HilD, y en MM-N solamente una vía de represión que requiera la acción solo de SlyA, para la inducción de la expresión de *ssrAB*. La necesidad de diferentes reguladores para la expresión de un gen en diferentes condiciones de crecimiento puede estar asociada a cambios en la topología del DNA. Previos estudios han mostrado el efecto que tienen las condiciones de crecimiento en la dinámica de la topología del DNA y, como consecuencia, en la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 (Cameron *et al.*, 2012; Golubeva *et al.*, 2012; Will *et al.*, 2014).

De manera muy interesante, en este trabajo encontramos que hay un circuito de regulación entre HilD y SlyA, en donde se regulan entre ellos de manera positiva e indirecta (Figura 23 y 24). Así, SlyA y HilD regularían la expresión de *ssrAB*, cada uno directamente, pero además, también indirectamente por el circuito de regulación que se forma entre estos reguladores (Figura 26). Se ha reportado que las proteínas SlyA y PhoP regulan cooperativamente la expresión de varios genes de virulencia y que establecen un circuito de regulación positiva entre ellas cuando se crece a *Salmonella* en medios mínimos (Kong *et al.*, 2008; Navarre *et al.*, 2005; Perez *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2009). Queda por identificarse los factores intermediarios en el circuito de regulación formado por SlyA y HilD. La

expresión de HilD se controla por múltiples reguladores, incluyendo a SirA/BarA, Csr, HilE, FliZ, OmpR, CpxR, Fis, HU, Fur, Lon y su propia autoregulación (Fàbrega *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2014; Wada *et al.*, 2011), mientras que la expresión de SlyA se regula por PhoP y su propia autoregulación (Pérez *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008). Así, SlyA y HilD podrían regularse entre sí a través de alguno de los factores ya conocidos que controlan su expresión, o de otros aún no caracterizados.

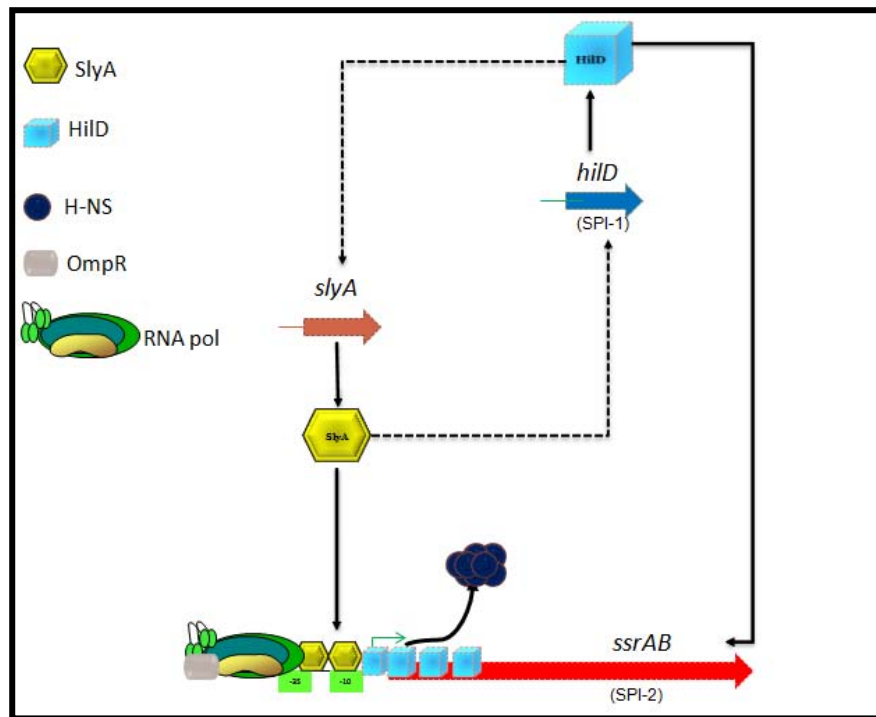


Fig. 26.- Circuito de regulación formado por SlyA y HilD que controla la expresión del operón *ssrAB* en medio LB. SlyA y HilD se regulan positivamente aumentando su concentración. Tanto SlyA como HilD desplazan en su totalidad las moléculas del represor H-NS unidas en la región reguladora del operón *ssrAB*, induciendo así su expresión y por lo tanto los genes de SPI-2. Líneas continuas implica que hay una regulación directa. Líneas discontinuas implica que hay regulación indirecta.

En conjunto, nuestros resultados revelan un novedoso y complejo mecanismo de regulación, en donde se requiere dos anti-represores de H-NS y un activador clásico para la expresión del operón *ssrAB* y por ende los genes de SPI-2.

Asimismo, nuestros resultados añaden una vía más en la cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SP1-1 y SPI-2, ya que observamos que hay un circuito de regulación positiva e indirecta entre SlyA y HilD.

El conocimiento obtenido en este trabajo permitirá llegar a entender mejor la regulación de la expresión genética tan precisa que se requiere para la patogénesis de *Salmonella*, en respuesta a cada nicho por el cual pasa la bacteria para infectar a sus hospederos.

VIII. PERSPECTIVAS.

Para elucidar con mayor precisión cómo es la acción cooperativa de los reguladores transcripcionales SlyA, HilD y OmpR, se propone las siguientes perspectivas:

- Realizar experimentos de transcripción *in vitro* usando diferentes combinaciones de SlyA, HilD, OmpR, H-NS y RNA polimerasa, para así confirmar la actividad de cada uno de estos reguladores.
- Obtener los sitios específicos de unión del represor H-NS sobre la región reguladora del operón *ssrAB* mediante experimentos de footprinting, para así determinar los posibles sitios de nucleación de este represor.
- Mutar los sitios de nucleación de H-NS y analizar su efecto en la expresión de *ssrAB* en LB y MM-N, para así determinar los sitios específicos de donde SlyA y HilD desplazan a H-NS.
- Determinar la secuencia de unión de SlyA en la región reguladora del operón *ssrAB* mediante experimentos de footprinting.

Para elucidar con más detalle el mecanismo de regulación entre SlyA y HilD, se propone las siguientes perspectivas:

- Identificar el regulador por el cual SlyA regula la expresión de HilD y viceversa.
- Evaluar la expresión de *ompR* en las mutantes $\Delta slyA$ y $\Delta hilD$, para así determinar si el circuito de regulación formado por SlyA y HilD también incluye a OmpR.

IX. APÉNDICE.**A. Medio de cultivos empleados.**

Medio rico en nutrientes Luria-Bertani (LB):

Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	10 g

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

Medio mínimo N (MM-N):

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

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

Medio SOC:

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

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

Medio SOB:

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

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

B. Reactivos utilizados para Western-blot.

Buffer de transferencia:

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

PBS 10X:

Na ₂ HPO ₄	6.1 g
KH ₂ PO ₄	2 g
KCl	2 g
NaCl	80 g

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

PBST:

PBS 10X	100 ml
Tween-20	3 ml

Solución bloqueadora:

Leche en polvo sin grasa	1.5 g
PBST	30 ml

X. BIBLIOGRAFÍA.

- Abrahams, G. L., & Hensel, M. (2006). Microreview Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. *Cellular Microbiology*, 8: 728–737.
- Alphen, W. V., & Lugtenberg, B. (1977). Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 131:623–630.
- Baños, R. C., Vivero, A., Aznar, S., García, J., Pons, M., Madrid, C., & Juárez, A. (2009). Differential regulation of horizontally acquired and core genome genes by the bacterial modulator H-NS. *PLoS Genetics*, 5: 0252-0258.
- Bispham, J., Tripathi, B. N., Watson, P. R., & 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. E., & Groisman, E. a. (2005). The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 57: 85–96.
- Brown NF, Vallance BA, Coombes BK, Valdez Y, Coburn BA, et al. (2005) *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS Pathogens*, 1: 0252–0258.
- Buchmeier, N., Bossie, S., Chen, C. Y., Fang, F. C., Guiney, D. G., & Libby, S. J. (1997). SlyA, a transcriptional regulator of *Salmonella* Typhimurium, is required for resistance to oxidative stress and is expressed in the intracellular environment of macrophages. *Infection and Immunity*, 65: 3725–3730.
- Bustamante, V. H., Martínez, L. C., Santana, F. J., Knodler, L. A., Steele-mortimer, O., & Puente, 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.
- Callaway, T. R., Edrington, T. S., Anderson, R. C., Byrd, J. A., & Nisbet, D. J. (2008). Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. *Journal of Animal Science*, 86: 14-21
- Cameron ADS, Dorman CJ (2012) A fundamental regulatory mechanism operating through OmpR and DNA topology controls expression of *Salmonella* pathogenicity islands SPI-1 and SPI-2. *PLoS Genetics*, 8: 1–10.
- Cardenal-Muñoz E, Ramos-Morales F (2011) Analysis of the expression, secretion and translocation of the *Salmonella enterica* type III secretion system effector SteA. *PLoS ONE*, 6: 10-16.
- Chakraborty S, Mizusaki H, Kenney LJ (2015) A FRET-Based DNA biosensor tracks OmpR-dependent acidification of *Salmonella* during macrophage infection. *PLoS Biology*, 3: 4-11.

- Christian Perez, J., Latifi, T., & Groisman, E. A. (2008). Overcoming H-NS-mediated transcriptional silencing of horizontally acquired genes by the PhoP and SlyA proteins in *Salmonella enterica*. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 10773–10783.
- Coburn, B., Li, Y., Owen, D., Vallance, B. A., & Finlay, B. B. (2005). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infection And Immunity*, 73: 3219–3227.
- Coombes, B. K., Coburn, B. A., Potter, A. A., Gomis, S., Mirakhur, K., Yuling Li, B., & Finlay, 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.
- Coombes, B. K., Wickham, M. E., Lowden, M. J., Brown, N. F., & Finlay, B. B. (2005). Negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 is required for contextual control of virulence during typhoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 17460–17465.
- Corbett, D., Bennett, H. J., Askar, H., Green, J., & Roberts, I. S. (2007). SlyA and H-NS regulate transcription of the *Escherichia coli* K5 capsule gene cluster, and expression of *slyA* in *Escherichia coli* is temperature- dependent, positively autoregulated, and independent of H-NS. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 33326–33335.
- De la Cruz MA, Pérez-Morales D, Palacios IJ, Fernández-Mora M, Calva E and Bustamante VH (2015) The two-component system CpxR/A represses the expression of *Salmonella* virulence genes by affecting the stability of the transcriptional regulator HilD. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1–14.
- Dieye, Y., Ameiss, K., Mellata, M., & Iii, R. C. (2009). The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *BMC Microbiology*, 14: 1–14.
- Dolan, K. T., Duguid, E. M., & He, C. (2011). Crystal Structures of SlyA Protein, a Master Virulence Regulator of *Salmonella*, in Free and DNA-bound States. *The Journal of Biological Chemistry*, 286: 22178–22185.
- Ehrbar, K., Friebel, A., Miller, S. I., & Hardt, W. (2003). Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) protein InvB in type III secretion of SopE and SopE2, two *Salmonella* effector proteins encoded outside of SPI-1, *Journal Of Bacteriology*, 185: 6950–6967.
- Ellison, D. W., & Miller, V. L. (2006). Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family. *Current Opinion in Microbiology*, 9: 153–159.
- Fàbrega, A., & Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26: 308–341.
- Fass, E., & Groisman, E. A. (2009). Control of *Salmonella* Pathogenicity island-2 gene expression. *Current Opinion in Microbiology*, 12: 199–204.
- Feng, X., Walthers, D., Oropeza, R., & 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., & Holden, D. W. (2012). Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology*, 158: 1147–1161.
- Gal-Mor O, Elhadad D, Deng W, Rahav G, Finlay BB (2011) The *Salmonella enterica* PhoP directly activates the horizontally acquired SPI-2 gene *sseL* and is functionally different from a *S. bongori* ortholog. *PLoS ONE*, 6: 5-14.
- Garmendia, J., Beuzón, C. R., Ruiz-Albert, J., & Holden, D. W. (2003). The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella* Typhimurium SPI-2 type III secretion system. *Microbiology*, 149: 2385–2396.
- Geddes, K., Worley, M., Niemann, G., & Heffron, F. (2005). Identification of new secreted effectors in. *Infection and Immunity*, 73: 6260–6271.
- Golubeva, Y. A., Sadik, A. Y., Ellermeyer, J. R., & Slauch, J. M. (2012). Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *Genetics*, 190: 79–90.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I. and Tschape, H. (1997). MicroReview Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology*, 23: 1089-1097.
- Hansen-wester, I., & Hensel, M., (2001). *Salmonella* Pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes and Infection*, 3: 549-559.
- Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nature Reviews. Microbiology*, 6: 53–66.
- Jones, B. D., Ghori, N., & Falkow, S. (1994). *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *The Journal of Experimental Medicine*, 180: 15–23.
- Kelly, A., Goldberg, M. D., Carroll, R. K., Danino, V., Hinton, J. C. D., & Dorman, C. J. (2004). A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, 150: 2037–2053.
- Knodler, L. a, & Steele-Mortimer, O. (2003). Taking possession: biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. *Traffic*, 4: 587–599.
- Knodler, L. A. (2014). *Salmonella enterica*: living a double life in epithelial cells. *Current Opinion in Microbiology*, 23: 23–31.
- Kolodziejek, A. M., & Miller, S. I. (2015). Microreview *Salmonella* modulation of the phagosome membrane, role of SseJ. *Cellular Microbiology*. 17: 333–341.
- Kong, W., Weatherspoon, N., & Shi, Y. (2008). Molecular mechanism for establishment of signal-dependent regulation in the PhoP / PhoQ system. *The Journal Of Biological Chemistry*, 283: 16612–16621.
- Kroger, C., Colgan, A., Srikumar, S., Handler, K., Sivasankaran, S. K., Hammarlof, D. L., Canals, R., Grissom, E. J., Conway, T., Hokamp, K., Hinton, J. C. D. (2013). An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella Enterica* serovar Typhimurium. *Cell Host and Microbe*, 14: 683–695.

- Lathrop SK, Binder KA, Starr T, Cooper KG, Chong A, Carmody AB, Steele- Mortimer O. 2015. Replication of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in human monocyte-derived macrophages. *Infection and Immunity*, 83: 2661–2671.
- Laughlin, R. C., Knodler, L. A., & Barhoumi, R. (2014). Spatial segregation of virulence gene expression during acute enteric infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *mBio*, 5: 946-957
- Lavigne, J. (2008). Molecular evolution of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and pathogenic *Escherichia coli* : From pathogenesis to therapeutics. *Infection, Genetics and Evolution*, 8: 217–226.
- Lee, A. K., Detweiler, C. S., & Falkow, S. (2000). OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Journal of Bacteriology*, 182: 771–781.
- Li, J., Overall, C. C., Nakayasu, E. S., Kidwai, A. S., Jones, M. B., Johnson, R. C., Nguyen, T. N., McDermott, E. J., Ansong C., Heffron, F., Cambronne, D. E., Adkins, J. N. (2015). Analysis of the *Salmonella* regulatory network suggests involvement of SsrB and H-NS in σ^E -regulated SPI-2 gene expression. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1–12.
- Lim, C. J., Lee, S. Y., Kenney, L. J., & Yan, J. (2012). Nucleoprotein filament formation is the structural basis for bacterial protein H-NS gene silencing. *Scientific Reports*, 2: 1–6.
- Linehan, S. a., Rytkönen, A., Yu, X. J., Liu, M., & 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.
- Lucas, R. L., & Lee, C. A. (2001). Roles of *hilC* and *hilD* in regulation of *hila* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal Of Bacteriology*, 183: 2733–2745.
- Lucchini S, Rowley G, Goldberg MD, Hurd D, Harrison M, et al. (2006) H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathogens*, 2: 0746–0752.
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., Jones, F. T., Fazil, A., Hoekstra, R. M. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50: 882–889.
- Martínez, L. C., Banda, M. M., Fernández-Mora, M., Santana, F. J., & Bustamante, V. H. (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., Martínez-Flores, I., Salgado, H., Fernández-Mora, M., Medina-Rivera, A., Puente, J. L., Collado-Vides J., Bustamante, V. H. (2014). *In silico* identification and experimental characterization of regulatory elements controlling the expression of the *Salmonella csrB* and *csrC* genes. *Journal of Bacteriology*, 196: 325–36.

- Martínez, L. C., Yakhnin, H., Camacho, M. I., Georgellis, D., Babitzke, P., Puente, J. L., & 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.
- Miao, E. a., & 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.
- Michael Hensel. (2004). Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*, 294: 95–102.
- Mills, S. D., Ruschkowski, S. R., Stein, M. A., & Finlay, B. B. (1998). Trafficking of porin-deficient *Salmonella* Typhimurium mutants inside HeLa cells: *ompR* and *envZ* mutants are defective for the formation of *Salmonella*-induced filaments. *Infection and Immunity*, 66: 1806–1811.
- Mirold, S., Ehrbar, K., Weissmüller, A., Tschäpe, H., Rüssmann, H., & Hardt, W. (2001). *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements , including *Salmonella* pathogenicity island. *Journal of Bacteriology*, 1: 2348–2358.
- Moest, T. P., & Méresse, S. (2013). *Salmonella* T3SSs: Successful mission of the secret(ion) agents. *Current Opinion in Microbiology*, 16: 38–44.
- Navarre, W. W., Halsey, T. A., Walthers, D., Frye, J., McClelland, M., Potter, J. L., Kenney, J. L., Gunn, S. J., Fang, C. F., Libby, S. J. (2005). Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Molecular Microbiology*, 56: 492–508.
- Okada, N., Oi, Y., Takeda-Shitaka, M., Kanou, K., Umeyama, H., Haneda, T., Miki, T., Hosoya, S., Danbara, H. (2007). Identification of amino acid residues of *Salmonella* SlyA that are critical for transcriptional regulation. *Microbiology*, 153: 548–560.
- Paytubi, S., Madrid, C., Forns, N., Nieto, J. M., Balsalobre, C., Uhlin, B. E., & Juárez, A. (2004). YdgT, the Hha paralogue in *Escherichia coli*, forms heteromeric complexes with H-NS and StpA. *Molecular Microbiology*, 54: 251–263.
- Perez, J. C., Latifi, T., & Groisman, E. A. (2008). Overcoming H-NS-mediated transcriptional silencing of horizontally acquired genes by the PhoP and SlyA proteins in *Salmonella enterica*. *The Journal Of Biological Chemistry*, 283: 10773–10783.
- Petrone, B. L., Stringer, A. M., & Wade, J. T. (2014). Identification of HilD-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 196: 1449-1453.,
- Prouty, A. M., Brodsky, I. E., Falkow, S., & Gunn, J. S. (2004). Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella* Typhimurium. *Microbiology*, 150: 775–783.

- Ryan, D., Pati, N. B., Ojha, U. K., Padhi, C., Ray, S., Jaiswal, S., Singh, P. G., Mannala, K. G., Shultze, T., Chakraborty, T., Suar, M. (2015). The acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium: global transcriptome and mutagenic analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 10: 2172-2185
- Schmidt, H., & Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17: 14–56.
- Singer, H. M., Kühne, C., Deditius, J. a., Hughes, K. T., & Erhardt, M. (2014). The *Salmonella* Spi1 virulence regulatory protein HilD directly activates transcription of the flagellar master operon *flhDC*. *Journal of Bacteriology*, 196: 1448–1457.
- Song, H., Kong, W., Weatherspoon, N., Qin, G., Tyler, W., Turk, J., & Iii, R. C. (2008). Modulation of the regulatory activity of bacterial two-component systems by SlyA. *The Journal Of Biological Chemistry*, 283: 28158–28168.
- Srikanth, C. V., Mercado-Lubo, R., Hallstrom, K., & McCormick, B. A. (2011). *Salmonella* effector proteins and host-cell responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68: 3687–3697.
- Srikumar S, Kröger C, Hébrard M, Colgan A, Owen SV, Sivasankaran SK, *et al.* (2015) RNA- seq brings new insights to the intra-macrophage transcriptome of *Salmonella* Typhimurium. *PLoS Pathogens*, 11:1–26.
- Stebbins, C. E., & Galán, J. E. (2003). Priming virulence factors for delivery into the host. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4: 738–743.
- Stoebel, D. M., Free, A., & Dorman, C. J. (2008). Anti-silencing: Overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. *Microbiology*, 154: 2533–2545.
- Vivero, A., Baños, R. C., Mariscotti, J. F., Oliveros, J. C., García-Del Portillo, F., Juárez, A., & Madrid, C. (2008). Modulation of horizontally acquired genes by the Hha-YdgT proteins in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 190: 1152–1156.
- Wada, T., Tanabe, Y., & Kutsukake, K. (2011). FliZ acts as a repressor of the *ydiV* gene, which encodes an Anti-FlhD4C2 factor of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal Of Bacteriology*, 193: 5191–5198.
- Will, W. R., Bale, D. H., Reid, P. J., Libby, S. J., & Fang, F. C. (2014). Evolutionary expansion of a regulatory network by counter-silencing. *Nature Communications*, 5: 5270-5279.
- Worley, M. J., Ching, K. H. L., & Heffron, F. (2000). *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Molecular Microbiology*, 36: 749–761.
- Wu, R. Y., Zhang, R. G., Zagnitko, O., Dementieva, I., Maltzev, N., Watson, J. D., Laskowski, R., Gornicki, P., Joachimiak, A. (2003). Crystal structure of *Enterococcus faecalis* SlyA-like transcriptional factor. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 20240–20244.

- Yang, J., Hocking, D. M., Cheng, C., Dogovski, C., Perugini, M. a, Holien, J. K., Parker, W M., Hartland, L. E., Tauschek, M., Robins-Browne, R. M. (2013). Disarming bacterial virulence through chemical inhibition of the DNA binding domain of an AraC-like transcriptional activator protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 288: 31115–26.
- Yoon H, McDermott JE, Porwollik S, McClelland M, Heffron F (2009) Coordinated Regulation of Virulence during Systemic Infection of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *PLoS Pathogens*, 5: 1371-1383 .
- Zhang K, Dupont A, Torow N, Gohde F, Leschner S, *et al.* (2014) Age-dependent enterocyte invasion and microcolony formation by *Salmonella*. *PLoS Pathogens*, 10: 4385-4390
- Zhao, G., Weatherspoon, N., Kong, W., Curtiss, R., & Shi, Y. (2008). A dual-signal regulatory circuit activates transcription of a set of divergent operons in *Salmonella* Typhimurium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 20924–20929.