



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Reclutamiento de actividades biológicas ancestrales para la virulencia de *Salmonella*, a través de la regulación transcripcional mediada por HilD

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

MC. MARCOS ANTONIO VALDESPINO DÍAZ

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN

Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. MARIO SOBERÓN CHÁVEZ

Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México. Junio, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo de investigación se realizó en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, bajo la asesoría del Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán y como parte del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la misma Universidad.

El Comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. Mario Soberón Chávez

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dra. Bertha González Pedrajo

(Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

El jurado designado para el Examen de Grado estuvo integrado por:

Dra. Gloria Soberón Chávez

(Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)

Dr. Juan Enrique Morett Sánchez

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. Adrián Ochoa Leyva

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. Rafael Peña Miller

(Instituto de Ciencias Genómicas, UNAM)

Dr. Daniel Genaro Segura González

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Para la realización de esta investigación, el alumno recibió beca CONACyT/México (No. 594831), así como apoyo de los proyectos DGAPA-UNAM (IN202418 y IN206321) y CONACyT (254531).

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. LISTA DE ABREVIATURAS	8
2. RESUMEN	10
3. ABSTRACT	11
4. INTRODUCCIÓN	12
4.1. El género <i>Salmonella</i>	12
4.2. Mecanismo de patogénesis de <i>Salmonella</i>	13
4.3. Factores de virulencia de <i>Salmonella</i>	15
4.3.1. Flagelo y quimiotaxis	16
4.3.2. Adhesinas	16
4.3.3. Sistema de secreción tipo III	17
4.4. Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i>	18
4.4.1. SPI-1	19
4.4.1.1. HilD	23
4.4.1.2. SprB	23
4.5. Respiración del nitrato	24
5. ANTECEDENTES	25
6. HIPÓTESIS	27
7. OBJETIVOS	27
8. MATERIALES Y MÉTODOS	28
8.1. Medios de cultivo	40
8.2. Construcción de plásmidos	40
8.3. Preparación de células electrocompetentes	43

8.4. Electroporación	44
8.5. Construcción de cepas mutantes	44
8.6. Construcción de cepas que expresan genes etiquetados con el epítipo FLAG	46
8.7. Cultivos bacterianos para cuantificar la expresión de los genes	47
8.8. Cuantificación de la actividad enzimática específica CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa)	48
8.9. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot	49
8.10. Ensayos de retardo en gel (EMSA's; Electrophoretic Mobility Shift Assays)	50
8.11. Ensayo de invasión a células HeLa	51
8.12. Ensayo de adherencia a células HeLa	52
8.13. Experimentos de infección en ratones	53
8.14. Análisis estadístico	55
9. RESULTADOS	56
9.1. Adaptación de la regulación transcripcional de <i>phoH</i> mediada por HilD	56
9.1.1. El gen <i>phoH</i> de <i>S. Typhimurium</i>, pero no el de <i>E. coli</i> K-12, es activado por HilD en condiciones inductoras de SPI-1	56
9.1.2. HilD induce específicamente la expresión del promotor P1 de <i>phoH</i>_{STm}	59
9.1.3. Cambios en la región reguladora del promotor P1 condujeron a la regulación de <i>phoH</i>_{STm} por HilD	60
9.1.4. Los genes <i>phoH</i>_{STm} y <i>phoH</i>_{Ec} son diferencialmente regulados por el represor H-NS	65
9.1.5. Los genes <i>phoH</i>_{STm} y <i>phoH</i>_{Ec} se regulan diferencialmente en respuesta a fósforo inorgánico	68
9.1.6. El gen <i>phoH</i>_{STm} interviene en la colonización intestinal en ratones	70
9.2. Adaptación de la regulación transcripcional de <i>yobH</i> mediada por HilD-SprB	72
9.2.1. La expresión de <i>yobH</i>_{STm} se favorece en condiciones inductoras de SPI-1	72

9.2.2. Los genes <i>yobH</i>_{STm} y <i>yobH</i>_{Ec} conservan los elementos <i>cis</i>-regulatorios que median la regulación por SprB	76
9.2.3. La regulación de <i>yobH</i> por SprB se requiere para la función de YobH en la adhesión e invasión de <i>S. Typhimurium</i> a células HeLa	79
9.2.4. La actividad de YobH no se requiere durante la infección de <i>S. Typhimurium</i> en ratones	81
9.3. Adaptación de la regulación transcripcional de <i>fdnG</i> mediada por HilD	83
9.3.1. El gen <i>fdnG</i> de <i>S. Typhimurium</i>, pero no el gen de <i>E. coli</i> K-12, es regulado por HilD en condiciones inductoras de SPI-1	83
9.3.2. Los genes <i>fdnG</i>_{STm} y <i>fdnG</i>_{Ec} son diferencialmente regulados por el represor H-NS	87
10. DISCUSIÓN	90
11. CONCLUSIONES	98
12. PERSPECTIVAS	101
13. CITAS BIBLIOGRÁFICAS	102
14. ANEXO Artículos publicados del Proyecto de Doctorado	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Progreso de la infección causada por <i>Salmonella</i>	14
Figura 2. Representación esquemática de los genes codificados en la isla de patogenicidad 1 de <i>Salmonella</i> (SPI-1) y sus funciones putativas	19
Figura 3. Red reguladora de SPI-1	21
Figura 4. Contexto genómico de los genes <i>phoH_{STm}</i> y <i>phoH_{Ec}</i> y representación esquemática de las fusiones <i>phoH_{STm}-cat</i> y <i>phoH_{Ec}-cat</i>	57
Figura 5. El gen <i>phoH_{STm}</i> , pero no <i>phoH_{Ec}</i> , se expresa y regula por HilD en condiciones inductoras de SPI-1	58
Figura 6. HilD regula directamente el promotor P1 de <i>phoH_{STm}</i>	60
Figura 7. HilD induce la expresión de <i>phoH_{STm}</i> actuando sobre una secuencia reguladora diferenciada entre <i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i>	61
Figura 8. HilD regula positivamente <i>phoH_{STm}</i> al unirse a un sitio que se superpone al promotor P1 de este gen	63
Figura 9. HilD antagoniza la represión mediada por H-NS en <i>phoH_{STm}</i>	66
Figura 10. La expresión de <i>phoH_{STm}</i> se activa en bajo Pi independientemente de PhoB o HilD	69
Figura 11. Efecto de <i>phoH_{STm}</i> en la colonización intestinal e infección sistémica de ratones por <i>S. Typhimurium</i>	71
Figura 12. YobH está conservada en las familias <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Erwiniaceae</i> y <i>Yersiniaceae</i>	73
Figura 13. El contexto genómico de <i>yobH</i> está conservado en <i>S. Typhimurium</i> y <i>E. coli</i> K-12	74
Figura 14. <i>yobH_{STm}</i> se expresa en condiciones relevantes para la virulencia de <i>S. Typhimurium</i>	75
Figura 15. <i>yobH_{STm}</i> y <i>yobH_{Ec}</i> son regulados por SprB	77

Figura 16. La regulación de <i>yobH</i> mediada por SprB interviene en la adhesión e invasión de <i>S. Typhimurium</i> a células HeLa	80
Figura 17. YobH y su regulación por SprB no intervienen en la infección de <i>S. Typhimurium</i> en un modelo de colitis en ratón	82
Figura 18. El contexto genómico de <i>fdnG</i> está conservado en <i>S. Typhimurium</i> y <i>E. coli</i> K-12	84
Figura 19. <i>fdnG_{STM}</i> , pero no <i>fdnG_{Ec}</i> , se expresa y regula por HilD en condiciones inductoras de SPI-1	86
Figura 20. HilD antagoniza la represión de H-NS sobre <i>fdnG_{STM}</i>	88
Figura 21. Representación de la adaptación reguladora de <i>phoH</i> por HilD en <i>S. Typhimurium</i>	91
Figura 22. Representación de la adaptación reguladora de <i>fdnG</i> por HilD en <i>S. Typhimurium</i>	92
Figura 23. Reclutamiento de la actividad de YobH para la virulencia de <i>S. Typhimurium</i>	95
Figura 24. Rearreglo de circuitos regulatorios de genes ancestrales en <i>S. enterica</i> mediados por HilD.....	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas	28
Tabla 2. Plásmidos utilizados	30
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados	35

1. LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ASB	Albúmina de suero bovino
Amp ^R	Resistente a ampicilina
ATP	Adenosín trifosfato
°C	Grados centígrados
C	Citocina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
G	Guanina
h	Hora
Ig	Inmunoglobulina
kb	Kilobase
Km ^R	Resistente a kanamicina
kV	Kilovoltios
M	Molar
µg	Microgramo
mg	Miligramo
min	Minuto
µl	Microlitro
ml	Mililitro
µM	Micromolar
µmol	Micromol
mM	Milimolar
ms	Milisegundo
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
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
Pi	Fósforo inorgánico
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa acoplada a transcripción reversa
s	Segundo
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
sRNA	RNA pequeño
Stp ^R	Resistente a estreptomicina
T	Timina
Tet ^R	Resistente a tetraciclina
UFCs	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta
V	Voltios
xg	Fuerza centrífuga relativa

2. RESUMEN

Un evento evolutivo durante la divergencia de *Salmonella* y *Escherichia coli* fue la adquisición por transferencia horizontal de la isla de patogenicidad de *Salmonella* 1 (SPI-1), necesaria para la invasión de las células huésped por parte de *Salmonella*. HilD es un regulador transcripcional en SPI-1, que induce la expresión de SPI-1 y muchos otros genes ubicados en otras regiones del cromosoma de *Salmonella*, incluyendo algunos genes ancestrales (también presentes en *E. coli* y otras bacterias), como *phoH* y *fdnG*; y *yobH* a través de SprB, otro regulador codificado en SPI-1. En este estudio, mostramos que tanto la ganancia de HilD como la evolución *cis*-reguladora llevaron a la integración de los genes *phoH* y *fdnG* en el regulón de HilD. Nuestros resultados indican que se generó una secuencia de unión a HilD en la región reguladora del gen *phoH* de *S. enterica* serovar Typhimurium, que media la activación del promotor 1 de este gen en condiciones inductoras de SPI-1; mientras que el gen *fdnG* de *S. Typhimurium*, pero no el gen *fdnG* de *E. coli*, se expresa y regula por HilD en las mismas condiciones. Además, encontramos que la represión por H-NS también se adaptó en los genes *phoH* y *fdnG* de *S. Typhimurium* y que HilD activa la expresión de estos genes al antagonizar a H-NS. Además, nuestros resultados revelaron que la expresión del gen *phoH* de *S. Typhimurium* también se activa en condiciones limitantes de fosfato, pero independientemente del sistema de dos componentes PhoR/B, conocido por regular el gen *phoH* de *E. coli* en respuesta a niveles bajos de fosfato. Por otro lado, determinamos que los genes *yobH* de *S. Typhimurium* y *E. coli* conservan los elementos en *cis* que median la regulación por SprB, por lo que la regulación de *yobH* en *S. Typhimurium* se adaptó con la adquisición de SPI-1, y no por cambios *cis*-regulatorios durante la divergencia de ambas bacterias. Igualmente, mostramos que la regulación de *yobH* por SprB se requiere para la función de la proteína YobH en la invasión de *S. Typhimurium* a células epiteliales, actividad que también conserva la proteína YobH de *E. coli*. En general, nuestros resultados ilustran el fenómeno de la regulación diferencial de genes ortólogos en bacterias e indican que la evolución *cis*-reguladora ha desempeñado un papel en la expansión del regulón de HilD.

3. ABSTRACT

An evolutionary event during the divergence of *Salmonella* and *Escherichia coli* was the acquisition by horizontal transfer of *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1), required for *Salmonella* invasion of host cells. HilD is a transcriptional regulator in SPI-1, inducing the expression of SPI-1 and many other genes located in other regions of the *Salmonella* chromosome, including some ancestral genes (also present in *E. coli* and other bacteria), such as *phoH* and *fdnG*; and *yobH* via SprB, another SPI-1-encoded regulator. In this study, we show that both HilD gain, and *cis*-regulatory evolution led to the integration of the *phoH* and *fdnG* genes into the HilD regulon. Our results indicate that a HilD binding sequence was generated in the regulatory region of the *phoH* gene of *S. enterica* serovar Typhimurium, which mediates the activation of promoter 1 of this gene under SPI-1-inducing conditions; while the *S. Typhimurium* *fdnG* gene, but not *E. coli* *fdnG* gene, is expressed and regulated by HilD under the same conditions. Furthermore, we found that repression by H-NS was also adapted in the *phoH* and *fdnG* genes of *S. Typhimurium* and that HilD activates the expression of these genes by antagonizing H-NS. In addition, our results revealed that *S. Typhimurium* *phoH* gene expression is also activated under phosphate-limiting conditions, but independently of the two-component PhoR/B system, known to regulate the *E. coli* *phoH* gene in response to low levels of phosphate. On the other hand, we determined that the *yobH* genes of *S. Typhimurium* and *E. coli* conserve the *cis*-elements that mediate regulation by SprB, so that the regulation of *yobH* in *S. Typhimurium* was adapted with the acquisition of SPI-1, and not by *cis*-regulatory mutations during the divergence of both bacteria. Likewise, we show that regulation of *yobH* by SprB is required for the function of YobH protein in the invasion of *S. Typhimurium* to epithelial cells, an activity that is also conserved by the YobH protein of *E. coli*. Overall, our results illustrate the phenomenon of differential regulation of orthologous genes in bacteria and indicate that *cis*-regulatory evolution has played a role in the expansion of the HilD regulon.

4. INTRODUCCIÓN

4.1.El género *Salmonella*

El género *Salmonella* perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* agrupa a bacterias Gram negativas en forma de bacilos, anaerobias facultativas, no formadoras de esporas y con flagelación peritrica (Coburn et al., 2007; Fàbrega and Vila, 2013). Este género comprende dos especies, *S. bongori* y *S. enterica* y esta última está formada por seis subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). Estas subespecies son clasificadas en más de 2600 serovariantes con base en los antígenos O (lipopolisacárido), H (flagelar) y K (capsular) (Brenner et al., 2000; Issenhuth-Jeanjean et al., 2014; Jajere, 2019).

Salmonella es una de las principales causas de enfermedades transmitidas por alimentos en todo el mundo, por lo que representa un problema para la salud pública. La infección por *Salmonella* puede causar desde una enfermedad intestinal local que provoca diarrea (salmonelosis), hasta una infección sistémica severa (fiebre entérica) (Haraga et al., 2008). Aunque se han reportado aislamientos de *S. bongori* en humanos, esta especie se asocia predominantemente a animales de sangre fría como reptiles, anfibios y peces y a muestras ambientales (Brenner et al., 2000; Giammanco et al., 2002; Nastasi et al., 1988). Las serovariantes que causan enfermedades en los seres humanos y otros animales de sangre caliente pertenecen en su mayoría (más del 99%) a *S. enterica* subespecie *enterica* (Eng et al., 2015). Algunas de las serovariantes de esta subespecie tienen un rango de hospedero muy restringido como es el caso de *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, las cuales causan fiebre entérica solamente en humanos. Sin embargo, otras serovariantes son capaces de infectar a humanos y una amplia variedad de animales, como *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, principales agentes causantes de salmonelosis a nivel mundial (Raffatellu et al., 2006; Santos et al., 2001).

Se estima que se producen anualmente entre 16 y 22 millones de casos de fiebre tifoidea y entre 200,000 y 600,000 muertes. La salmonelosis por su parte es la infección por *Salmonella* más común en todo el mundo, con 93,8 millones de casos que provocan 155.000 muertes por año aproximadamente. Sin embargo, la información de vigilancia epidemiológica suele ser escasa debido a informes deficientes y la inexactitud del diagnóstico, por lo que estas cifras pudieran ser aún mayores (Majowicz et al., 2010; Mayer and Neilson, 2010).

4.2.Mecanismo de patogénesis de *Salmonella*

La infección por *Salmonella* se produce principalmente por el consumo de alimentos y agua contaminados, aunque el contacto con animales domésticos y silvestres como aves de corral, ganado, reptiles y anfibios que pueden ser portadores de la bacteria, también constituye un riesgo de infección en humanos (Foley et al., 2008; Horton et al., 2013; Tauxe, 1991). El primer obstáculo por superar dentro del huésped es el pH ácido del estómago. Para protegerse contra el choque ácido severo, *Salmonella* activa una respuesta de tolerancia al ácido que le permite mantener el pH intracelular en valores superiores a los del entorno extracelular (Foster and Hall, 1991). Después de entrar en el intestino delgado, las bacterias atraviesan la mucosa intestinal y evitan ser destruidas por enzimas digestivas, sales biliares, IgA secretora, péptidos antimicrobianos y otras defensas del sistema inmune innato para acceder al epitelio subyacente (Haraga et al., 2008).

Una vez en la porción distal del intestino delgado, *Salmonella* tiene la capacidad de invadir a las células epiteliales aprovechando principalmente las capacidades fagocíticas de las células M y las células dendríticas cuyas proyecciones se extienden hasta el lumen intestinal. Además, la bacteria también fuerza su propia endocitosis en células epiteliales no fagocíticas como los enterocitos, para lo cual se sirve de adhesinas y fimbrias que le permiten la adhesión al epitelio intestinal (Hume et al., 2017; Santos and Bäumlér, 2004; Tahoun et al., 2012). Poco después de la adhesión, el proceso de

invasión aparece como consecuencia de la activación de las vías de señalización de la célula huésped que conducen a profundos reordenamientos citoesqueléticos. Estas modificaciones internas interrumpen el borde en cepillo del epitelio normal e inducen la formación subsiguiente de invaginaciones de la membrana que envuelven a las bacterias en vesículas llamadas vacuolas contenedoras de *Salmonella* (SCV, del inglés *Salmonella*-containing vacuole) (Fig. 1) (Finlay et al., 1991; Francis et al., 1993). Simultáneamente, la inducción de una respuesta secretora en el epitelio intestinal inicia el reclutamiento y la trans migración de fagocitos desde el espacio submucoso hacia el lumen intestinal. Este proceso está asociado con la producción de varias citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-8 (IL-8) (Fàbrega and Vila, 2013).

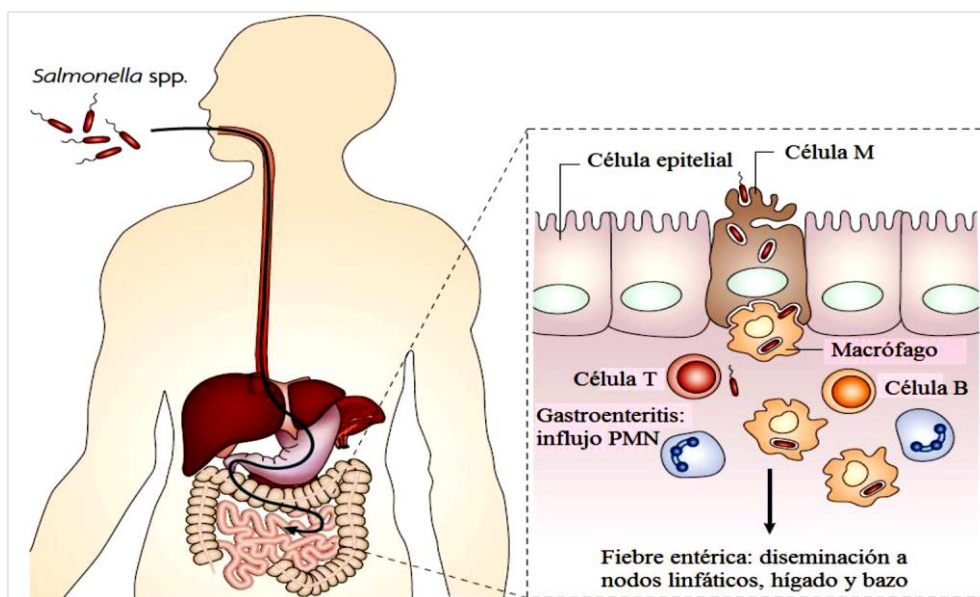


Fig. 1. Progreso de la infección causada por *Salmonella*. Al ser ingerida oralmente, *Salmonella* resiste el pH ácido del estómago y alcanza el lumen intestinal. Las bacterias invaden las células epiteliales, provocando la infección intestinal. Simultáneamente se induce una respuesta inflamatoria intestinal. Una vez que *Salmonella* atraviesa el epitelio, es internalizada por células fagocíticas del sistema inmune y diseminada a otros órganos, provocando una infección sistémica. PMN se refiere a leucocitos polimorfonucleares (Adaptado de Haraga et al., 2008).

Generalmente las serovariantes no tifoideas como *S. Typhimurium* permanecen localizadas en los tejidos intestinales, donde la respuesta inflamatoria del huésped ante algunas proteínas de superficie como la flagelina, la capa LPS y otros efectores secretados es responsable de los síntomas de la gastroenteritis (Fàbrega and Vila, 2013; Zhang et al., 2003). Sin embargo, en los casos de gastroenteritis por *Salmonella*, solo una pequeña proporción de las bacterias ingeridas invaden el epitelio intestinal. La mayor parte de la población permanece en el lumen intestinal, donde obtiene una ventaja selectiva sobre la microbiota residente debido a la respuesta inflamatoria del huésped en respuesta a la pequeña subpoblación invasora (Hume et al., 2017). Adicionalmente, en pacientes inmunocomprometidos y en ratones de laboratorio modificados genéticamente, *S. Typhimurium* puede llegar a sobrevivir y replicarse en células fagocíticas como los macrófagos y posteriormente en PMN y células mononucleares, lo que le permite la diseminación sistémica colonizando órganos como el bazo y el hígado, induciendo así los síntomas de la fiebre enterica (Fàbrega and Vila, 2013; Gordon et al., 2002). Esta capacidad que tiene *S. Typhimurium* de provocar una infección intestinal localizada o una infección sistémica dependiendo del hospedero en el que se encuentre, la han convertido en el modelo de estudio por excelencia de los mecanismos moleculares que emplea *S. enterica* en su interacción con el hospedero; ya sea a través de un modelo de infección en ratones, bovino o de cultivos celulares (Haraga et al., 2008).

4.3. Factores de virulencia de *Salmonella*

Para lograr con éxito el establecimiento de la infección, *S. enterica* posee muchas estrategias de virulencia para interactuar con los mecanismos de defensa del huésped. La mayoría de los genes que codifican los factores de virulencia más importantes se encuentran dentro de las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs, del inglés *Salmonella Pathogenicity Islands*), mientras que otros se encuentran en un plásmido de virulencia (pSLT) o en el cromosoma. Estos factores incluyen

sistemas de adhesión, al flagelo, los sistemas de secreción de tipo 3 (SST3) codificados en algunas SPIs, la cápsula y los componentes esenciales para la formación de la biopelícula (Fàbrega and Vila, 2013; Jajere, 2019).

4.3.1. Flagelo y quimiotaxis

Los flagelos son un largo filamento helicoidal acoplado a motores giratorios dentro de la membrana externa y la pared celular, lo que permite que *Salmonella* se movilice a través de la barrera epitelial después de la ingestión (de Jong et al., 2012). Los flagelos se requieren no solo para la motilidad y la quimiotaxis, sino también para otros procesos en la patogénesis. La síntesis y función del sistema flagelar y de quimiotaxis requiere la expresión de más de 50 genes que se dividen en al menos 17 operones, cuyo regulador maestro es la proteína FlhD₄C₂. *In vitro*, la expresión de los genes flagelares ocurre en la fase temprana de crecimiento exponencial; mientras que en *in vivo* juegan un papel primordial en las etapas iniciales de la patogénesis, permitiendo que *Salmonella* alcance el epitelio intestinal para una adecuada adhesión e invasión (Fàbrega and Vila, 2013; Saini et al., 2010).

4.3.2. Adhesinas

La mayoría de los patógenos muestran un arsenal complejo de estructuras adhesivas que va desde moléculas individuales hasta nanomáquinas macromoleculares altamente elaboradas que son indispensables para la colonización y el establecimiento de la infección (Kline et al., 2009). Los dos grupos principales de estructuras adhesivas son las adhesinas fimbriales y no fimbriales, las cuales difieren según sus vías de ensamblaje (Soto and Hultgren, 1999).

S. enterica codifica hasta 13 adhesinas fimbriales y al menos 7 no fimbriales, según el serotipo. Entre los operones fimbriales se encuentran aquellos que codifican para las fimbrias tipo I, las curli,

las Pef y las Std.(Hansmeier et al., 2017; Wagner and Hensel, 2011). Varios estudios han mostrado que las fimbrias están involucradas en varios procesos patogénicos como la formación de biopelículas, la colonización y el ataque inicial de la bacteria al huésped (de Jong et al., 2012). Sin embargo, la inactivación individual de estas adhesinas solo afecta moderadamente la virulencia en ratones, mientras que una combinación de tales mutaciones disminuye significativamente la capacidad infecciosa, lo que sugiere que su contribución puede estar enmascarada por la pluralidad y los efectos de compensación funcional de estos determinantes (Fàbrega and Vila, 2013; Van Der Velden et al., 1998).

A diferencia de las adhesinas fimbriales, las adhesinas no fimbriales son un grupo heterogéneo de adhesinas. Este grupo comprende adhesinas mono y oligoméricas que se secretan a través de un sistema de secreción de tipo I (SiiE y BapA), autotransportadas a través de las membranas bacterianas (MisL, ShdA y SadA) o proteínas de la membrana externa (PagN y RcK) (Hansmeier et al., 2017). Particularmente la adhesina gigante SiiE, codificada en SPI-4, constituye un factor de colonización específico del huésped en el ganado bovino y para la infección intestinal en ratones (Morgan et al., 2004).

4.3.3. Sistema de secreción tipo III

La secreción de proteínas tiene un papel fundamental en la interacción entre las bacterias y otros organismos. Para lograr esto, las bacterias han desarrollado siete sistemas de secreción (tipo I al tipo VII) (Costa et al., 2015). De estos, el sistema de secreción tipo III (SST3) es uno de los sistemas más sofisticados y mejor estudiados (Portaliou et al., 2016). Los SST3 están ampliamente distribuidos entre las bacterias Gram-negativas y abarcan tres membranas celulares, las membranas bacterianas interna y externa y la membrana de la célula huésped eucariota, lo que permite que las bacterias secreten proteínas efectoras en las células huésped, en las que afectan las funciones celulares que

contribuyen a la supervivencia y colonización bacteriana. Los SST3 están relacionados evolutivamente con los flagelos y muchas subestructuras y componentes que están involucrados en su ensamblaje están altamente conservados. El ensamblaje y la función de estas complejas estructuras requieren más de 20 proteínas. Los SST3 comprenden varias subestructuras, incluido un complejo de ATPasa citosólica, un anillo citoplasmático, un aparato de exportación de membrana interna, un cuerpo basal, y un poro de translocación que se encuentra en la membrana de la célula huésped (Abby and Rocha, 2012; Deng et al., 2017).

Salmonella tienen dos SST3 distintos: uno codificado en la Isla de patogenicidad de *Salmonella* 1 (SPI-1), que utiliza para invadir las células huésped, establecer las SCVs e inhibir la apoptosis de la célula huésped; y otro en SPI-2, que emplea para manipular el tráfico y la maduración de las SCVs y para promover la supervivencia y replicación intracelular (Fàbrega and Vila, 2013).

4.4. Islas de patogenicidad de *Salmonella*

Las islas de patogenicidad son grandes grupos de genes (10–100 kb) presentes en el genoma de bacterias patógenas y ausentes en el genoma de cepas no patógenas de la misma especie o estrechamente relacionadas. Por lo general, el contenido de G + C y el uso de codones difieren del resto del genoma y tienen secuencias en los extremos que presentan homología con elementos de inserción, transposones y profagos; características que respalda la noción de ser adquiridas a través de transferencia horizontal de genes. La presencia de genes asociados a la virulencia, cuyos productos facilitan el proceso de infección, favorece el proceso infectivo de las bacterias patógenas (Gal-Mor and Finlay, 2006; Nieto et al., 2016). La mayoría de los genes de virulencia de *Salmonella* se encuentran agrupados en las más de 20 SPIs descritas en este género (Desai et al., 2013). Estos genes desempeñan un papel crucial en la patogénesis de *Salmonella*, específicamente en la colonización intestinal, invasión, replicación y supervivencia intracelular (Hensel, 2004; Sana et al., 2016).

4.4.1. SPI-1

SPI-1 consta de una región de 40 kb, que incluye 39 genes que codifican un sistema de secreción tipo 3 (SST3-1) y sus chaperonas y proteínas efectoras, así como algunos reguladores transcripcionales (SprB, HilC, HilD, HilA e InvF) que controlan la expresión de muchos genes de virulencia ubicados dentro y fuera de SPI-1 (Fig. 2) (Lou et al., 2019). SPI-1 es la isla mejor caracterizada dentro de *Salmonella* y los genes codificados en esta región son esenciales en la etapa de invasión a través del epitelio intestinal (dos Santos et al., 2019; Fàbrega and Vila, 2013). Los operones *prg/org* e *inv/spa* codifican para el complejo-aguja del SST3-1, mientras que en el operón *sic/sip* se encuentran codificadas las proteínas efectoras AvrA, SipA y SptP, así como las translocadoras SipBCD (Fig. 2). Estos efectores se internalizan a la célula huésped por medio del SST3-1, desencadenando el reordenamiento del citoesqueleto de actina y por lo tanto, la internalización de las bacterias (Fàbrega and Vila, 2013).

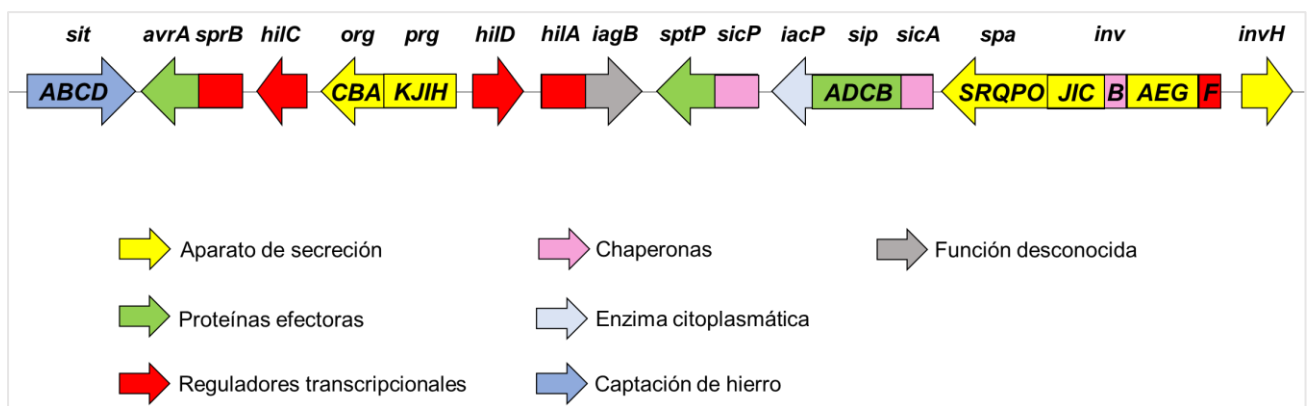


Fig. 2. Representación esquemática de los genes codificados en la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1) y sus funciones putativas (Adaptado de Fàbrega and Vila, 2013).

Salmonella ha adaptado mecanismos complejos que controlan la expresión de sus genes de virulencia en el tiempo y nicho apropiado. *In vivo*, los genes de SPI-1 se expresan cuando las bacterias

se encuentran en el lumen intestinal o en el citosol de células epiteliales (Laughlin et al., 2014), donde existen varias condiciones ambientales, como un bajo nivel de oxígeno, alta osmolaridad, pH ligeramente alcalino y la presencia de ciertos ácidos grasos, que favorecen su expresión (Altier, 2005; Golubeva et al., 2016; Lawhon et al., 2002). *In vitro*, los genes de SPI-1 se expresan durante el crecimiento en la fase estacionaria temprana en medios de cultivo ricos en nutrientes como el medio LB, condiciones que asemejan a algunas de las encontradas en el ambiente intestinal (Altier, 2005; Lundberg et al., 1999; Martínez et al., 2014).

La expresión de los genes de SPI-1 está finamente controlada por reguladores que se encuentran tanto dentro como fuera de esta isla (Fàbrega and Vila, 2013). Los reguladores transcripcionales HilD y HilC, codificados en SPI-1, y RtsA, codificado en otra región del cromosoma, forman un circuito de retroalimentación positiva que induce la expresión de SPI-1 (Ellermeier et al., 2005) (Fig. 3). Estos tres reguladores pertenecientes a la familia AraC/XylS contrarrestan la represión que ejerce H-NS sobre sus propios promotores y sobre el promotor de *hilA*, permitiendo sus expresiones (Olekhovich and Kadner, 2007; Schechter and Lee, 2001). En este circuito HilD es el regulador principal, mientras que HilC y RtsA amplifican la señal (Ellermeier et al., 2005). A su vez, HilA (familia OmpR/ToxR) activa la expresión de los operones *prg/org* e *inv/spa*, incluyendo a *invF*. Entonces InvF (familia AraC/XylS) induce la expresión del operón *sic/sip*, lo que conlleva a la expresión del resto de los genes de SPI-1 (Fàbrega and Vila, 2013) (Fig. 3). Además, el circuito formado por HilD, HilC y RtsA también puede activar la expresión de *invF* y algunas proteínas efectoras de manera independiente a HilA; lo que posibilita la expresión de SPI-1 mediante diferentes rutas (Colgan et al., 2016; Fàbrega and Vila, 2013; Thijs et al., 2007).

traducción. Sin embargo, en condiciones inductoras de SPI-1 el sistema de dos componentes BarA/SirA activa la expresión de los RNAs pequeños CsrB y CsrC, que secuestran a CsrA, lo que permite la activación de *hilD* y de SPI-1 (Martínez et al., 2011) (Fig. 3).

Otro sistema de dos componentes que induce la expresión de los genes de SPI-1 es EnvZ/OmpR. Se plantea que este sistema actúa sobre HilD de manera postranscripcional (Fàbrega and Vila, 2013) y recientemente se ha determinado que su efecto positivo se debe en parte a la represión transcripcional que ejerce sobre el RNA pequeño MicC, el cual bloquea la traducción de *hilD* (Cakar et al., 2022). El sistema PhoQ/PhoP se activa cuando *Salmonella* se encuentra dentro de las SCVs y SPI-1 no es requerido (Ibarra et al., 2010; Laughlin et al., 2014). En estas condiciones PhoP regula negativamente a *hilA* a través de múltiples mecanismos: represión transcripcional directa del promotor de *hilA*, represión transcripcional indirecta de los promotores de *hilD* y *rtsA*, y activación del RNA pequeño PinT, que reprime la traducción de varios reguladores positivos de SPI-1 (Kim et al., 2019; Palmer et al., 2019) (Fig. 3). El sistema PhoR/PhoB se activa en condiciones de bajo fósforo inorgánico extracelular e induce la expresión de los genes *fimYZ*, que a su vez activan la expresión de HilE y por tanto se inactiva a HilD (Jones, 2005; Lucas et al., 2000) (Fig. 3). En condiciones inductoras de SPI-2, en las cuales no es necesaria la expresión de SPI-1, se ha demostrado que el sistema de dos componentes SsrA/SsrB, principal activador de SPI-2, reprime la expresión de *hilD* e *hilA* por unión directa de SsrB al promotor de ambos genes (Pérez-Morales et al., 2017). Otros reguladores como FliZ y Fur regulan positivamente la expresión de los genes de SPI-1, el primero regula postranscripcionalmente la expresión de *hilD* y el segundo se une directamente y activa el promotor de *hilD* (Altier, 2005; Fàbrega and Vila, 2013; Teixidó et al., 2011). Por otra parte, la proteasa Lon regula negativamente a SPI-1 al degradar a HilD y HilC (Takaya et al., 2005) (Fig. 3).

4.4.1.1. HilD

Como se mencionó anteriormente, HilD pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS. Consta de 309 aminoácidos, su tamaño es de 34.3 kDa y tiene dos dominios HTH de unión a DNA en su extremo C-terminal. Además, HilD es capaz de dimerizar y de esta forma inducir la expresión de sus genes blanco (Grenz et al., 2018; Paredes-Amaya et al., 2018; Schechter and Lee, 2001).

HilD es el principal regulador de los genes de SPI-1 y actúa como un interruptor para integrar diversas señales ambientales e iniciar la activación de la expresión de los genes de esta isla (Ellermeier et al., 2005; Golubeva et al., 2012; Lawhon et al., 2002). HilD también regula, directa o indirectamente, la expresión de varios genes que se encuentran en otras islas genómicas, interconectando sus expresiones a la de los genes de SPI-1, como son los casos de *sinR*, *gtgE*, *sigD* y *siiA* (Colgan et al., 2016; Martínez-Flores et al., 2016; Petrone et al., 2014). Asimismo, HilD induce la expresión de los genes de SPI-2, favoreciendo la transición del fenotipo de invasión al intracelular (Bustamante et al., 2008); o incluso ha reclutado la movilidad para la virulencia de *Salmonella*, a través de la regulación que ejerce sobre el gen ancestral *flhDC*, regulador maestro de los genes del flagelo y quimiotaxis (Singer et al., 2014).

4.4.1.2. SprB

El regulador transcripcional SprB está codificado en SPI-1, pertenece a la familia de reguladores LuxR/UhpA y contiene un dominio HTH de unión a DNA en el extremo C-terminal. Sin embargo, SprB no regula la expresión de los genes de SPI-1, por lo que se ha planteado que su función es conectar la expresión de SPI-1 con la de otros genes fuera de esta isla (Eichelberg et al., 1999; Saini and Rao, 2010). La expresión de *sprB* es activada por HilA (Saini and Rao, 2010) y recientemente se ha determinado que HilD es capaz de antagonizar la represión que ejerce H-NS sobre su promotor

(Banda et al., 2019a). Recientes esfuerzos por dilucidar el regulón de SprB han mostrado que este regulador activa la expresión de varios genes hipotéticos y de algunos relacionados a la virulencia de *Salmonella* (Banda et al., 2019a; Smith et al., 2016).

4.5. Respiración del nitrato

La respuesta inflamatoria intestinal provocada por *Salmonella* proporciona, además de la alteración de la composición de la microbiota, una fuente localizada de nutrientes de alta energía. La motilidad y la quimiotaxis permiten que *Salmonella* acceda de manera eficiente a estos nutrientes y se acumulen en áreas proximales, lo que resulta en una replicación más rápida y un beneficio competitivo sobre la microbiota del intestino (Rivera-Chávez et al., 2013; Stecher et al., 2007). Las células del hospedero, sobre todo los macrófagos, liberan nitrato (NO₃⁻) al lumen intestinal durante el proceso inflamatorio provocado por *Salmonella*. Este nitrato es preferentemente utilizado como aceptor final de electrones por la bacteria, presumiblemente debido a su alto potencial redox estándar (Fàbrega and Vila, 2013; Lopez et al., 2012). Diversos estudios destacan la importancia del nitrato como un aceptor de electrones energéticamente valioso que favorece la colonización del lumen intestinal inflamado de ratones (Lopez et al., 2015, 2012; Rivera-Chávez et al., 2013).

Por su parte, el formiato producido por las bacterias a partir del piruvato durante la anaerobiosis sirve como un eficiente donador de electrones para la reducción final del nitrato a nitrito. La oxidación del formiato durante la respiración por nitrato es catalizada por el complejo enzimático formiato deshidrogenasa-N (Fdh-N) (Berg and Stewart, 1990; Wang and Gunsalus, 2003). La enzima Fdh-N es codificada por el operón *fdnGHI* y su expresión está acoplada a la expresión de la nitrato reductasa NarGHJI, a concentraciones medias y altas de nitrato en *E. coli* K-12 (Wang and Gunsalus, 2003).

5. ANTECEDENTES

En estudios recientes de nuestro grupo de investigación, así como en recientes análisis de transcriptoma, se identificaron nuevos genes regulados por HilD en *S. Typhimurium*, incluyendo varios genes ancestrales, como *phoH*, *yobH* y *fdnG* (Banda et al., 2019a; Colgan et al., 2016; Martínez-Flores et al., 2016; Smith et al., 2016). Estos genes se encuentran en muchas otras bacterias que no tienen a HilD, como *E. coli* K-12 y otras bacterias no patógenas; donde sus funciones no deben estar relacionada a virulencia: *phoH* codifica para una proteína con actividad ATPasa, *yobH* codifica para un polipéptido de función desconocida y *fdnG* codifica para la enzima formiato deshidrogenasa.

Nuestros resultados previos indican que el gen *phoH* de *S. Typhimurium*, pero no *phoH* de *E. coli* K-12, se expresa en medios de cultivo ricos en nutrientes, como LB, condiciones que favorecen la expresión de los genes de SPI-1 en *Salmonella* (Valdespino-Díaz M.A., Tesis de Maestría). Por otro lado, nuestros análisis indican que tanto la secuencia de nucleótidos del gen estructural *phoH*, como la respectiva secuencia de aminoácidos, presentan una identidad mayor al 82% entre *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12. En contraste, la región reguladora corriente arriba de *phoH* presenta baja identidad entre *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12, sugiriendo que cambios en la región reguladora pueden haber generado nuevos mecanismos de control en *Salmonella*, como el mediado por HilD.

Estudios de nuestro grupo demuestran que el gen *yobH* de *S. Typhimurium* es regulado indirectamente por HilD a través del regulador transcripcional SprB, el cual también se codifica en SPI-1 (Banda et al., 2019a). Además, una cepa de *S. Typhimurium* mutante en *yobH* presenta afectada la capacidad de invadir células HeLa y macrófagos RAW264.7 (Banda et al., 2019a).

Por su parte, FdnG forma parte de la enzima formiato deshidrogenasa la cual participa en la cadena respiratoria del formiato-nitrato en *E. coli*. La enzima oxida el formiato a CO₂ pasando electrones a la reserva de quinonas u otras proteínas para la posterior reducción del nitrato a nitrito

(Wang and Gunsalus, 2003). Coincidentemente *S. Typhimurium* se beneficia de la inflamación intestinal aguda, en parte mediante el uso del nitrato derivado del huésped para respirar anaeróbicamente y competir con éxito contra la microbiota durante el crecimiento en el lumen intestinal (Lopez et al., 2015).

Estos antecedentes sugieren que la evolución de la patogenicidad de *Salmonella* ha involucrado el reclutamiento de actividades celulares ancestrales, como la de *phoH*, *yobH* y *fdnG*, mediante la adaptación de mecanismos de regulación transcripcional mediados por HilD.

6. HIPÓTESIS

La evolución de la patogenicidad de *Salmonella* involucra el reclutamiento para la virulencia de las actividades celulares codificadas en los genes ancestrales *phoH*, *yobH* y *fdnG*, a través de la regulación transcripcional mediada por HilD.

7. OBJETIVOS

- Objetivo General

Determinar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de los genes ancestrales *phoH*, *yobH* y *fdnG* por HilD y su relevancia para la virulencia de *Salmonella enterica*.

- Objetivos Específicos

- 1) Determinar el mecanismo por el cual HilD regula positivamente la expresión de los genes *phoH*, *yobH* y *fdnG*.
- 2) Determinar si la regulación de *phoH* y *fdnG* por HilD y de *yobH* por HilD-SprB se adaptó mediante cambios en sus regiones reguladoras durante la divergencia de *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12.
- 3) Determinar si los genes *phoH* y *fdnG* están involucrados en la virulencia de *S. Typhimurium*.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

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

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas

Cepas	Descripción*	Referencia
<u>S. Typhimurium</u>		
SL1344	Cepa silvestre; <i>xyl</i> , <i>hisG</i> , <i>rpsL</i> ; Stp ^R	(Hoiseth and Stocker, 1981)
DTM142	Derivada de SL1344; <i>phoH::3XFLAG-km</i> , Stp ^R , Km ^R	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
JPTM25	Derivada de Δ <i>hilD::km</i> ; Δ <i>hilD</i> , Stp ^R	(Martínez et al., 2011)
DTM143	Derivada de Δ <i>hilD</i> ; Δ <i>hilD</i> <i>phoH::3XFLAG</i> , Stp ^R	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
DTM144	Derivada de SL1344; Δ <i>phoB::km</i> , Stp ^R , Km ^R	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
DTM145	Derivada de Δ <i>phoB::km</i> ; Δ <i>phoB</i> , Stp ^R	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
DTM146	Derivada de Δ <i>phoB</i> ; Δ <i>phoB</i> <i>phoH::3XFLAG-km</i> , Stp ^R , Km ^R	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
DTM150	Derivada de SL1344; Δ <i>phoH::km</i> , Stp ^R , Km ^R	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
DTM151	Derivada de SL1344; Δ <i>siiE::km</i> , Stp ^R , Km ^R	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
DTM122	Derivada de Δ <i>sprB::km</i> ; Δ <i>sprB</i> , Stp ^R	(Banda et al., 2019a)

DTM125	Derivada de $\Delta yobH::km$; $\Delta yobH$, Stp^R	(Banda et al., 2019a)
DTM126	Derivada de $\Delta yobH$; $\Delta yobH + yobH::3XFLAG-km$, Stp^R , Km^R	(Banda et al., 2019a)
DTM128	Derivada de $yobH::3XFLAG-km$; $yobH::3XFLAG$, Stp^R	(Banda et al., 2019a)
DTM132	Derivada de $\Delta sprB yobH::3XFLAG-km$; $\Delta sprB yobH::3XFLAG$, Stp^R	(Banda et al., 2019a)
DTM152	Derivada de $\Delta yobH$; $\Delta yobH + yobH_{Ec}::3XFLAG-km$, Stp^R , Km^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
DTM153	Derivada de $\Delta yobH$; $\Delta yobH + yobH_{STm_mut}::3XFLAG-km$, Stp^R , Km^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
DTM154	Derivada de SL1344; $\Delta invC::km$, Stp^R , Km^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
DTM155	Derivada de $\Delta invC::km$; $\Delta invC$, Stp^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
DTM156	Derivada de $\Delta invC$; $\Delta invC \Delta yobH::km$, Stp^R , Km^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
DTM157	Derivada de $\Delta yobH + yobH::3XFLAG-km$; $\Delta invC::km \Delta yobH + yobH::3XFLAG$, Stp^R , Km^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
DTM158	Derivada de $\Delta yobH + yobH_{Ec}::3XFLAG-km$; $\Delta invC::km \Delta yobH + yobH_{Ec}::3XFLAG$, Stp^R , Km^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
DTM159	Derivada de $\Delta yobH + yobH_{STm_mut}::3XFLAG-km$; $\Delta invC::km \Delta yobH + yobH_{STm_mut}::3XFLAG$, Stp^R , Km^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
<i>fdnG::3XFLAG-km</i>	Derivada de SL1344; <i>fdnG::3XFLAG-km</i> , Stp^R , Km^R	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
MG1655	Cepa silvestre; prototrófica <i>E. coli</i> K-12	Michael Cashel

DH10 β	Cepa de laboratorio, Stp ^R	Invitrogen
MC4100	F - (<i>araD139</i>) Δ (<i>argF-lac</i>)169 λ - <i>e14-flhD5301</i> Δ (<i>fruK-yeiR</i>) 725(<i>fruA25</i>) <i>relA1 rpsL150</i> (SmR) <i>rbsR22</i> Δ (<i>fimB-fimE</i>)632(<i>::IS1</i>) <i>deoC1</i> , Stp ^R	(Ferenci et al., 2009)
BL21/DE3	Cepa para la expresión de proteínas recombinantes	Invitrogen
JPMC34	Derivada de MC4100 Δ <i>hns::km</i> ; MC4100 Δ <i>hns</i> , Stp ^R	(Bustamante et al., 2011)
JW0389	Derivada de BW25113; BW25113 Δ <i>phoB::km</i> , Km ^R	(Baba et al., 2006)
DTM147	Derivada de MG1655; <i>phoH::3XFLAG-km</i> , Km ^R	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
DTM148	Derivada de BW25113 Δ <i>phoB::km</i> ; BW25113 Δ <i>phoB</i>	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
DTM149	Derivada de BW25113 Δ <i>phoB</i> ; BW25113 Δ <i>phoB phoH::3XFLAG-km</i> , Km ^R	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
DTM160	Derivada de MG1655; <i>yobH::3XFLAG-km</i> , Km ^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
DTM161	Derivada de <i>yobH::3XFLAG-km</i> ; <i>yobH::3XFLAG</i>	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)

*Amp^R, resistencia a ampicilina; Km^R, resistencia a la kanamicina; Stp^R, resistencia a la estreptomicina

Tabla 2. Plásmidos utilizados

Plásmido	Descripción*	Referencia
pKK232-8	Derivado del pBR322, contiene el gen cloranfenicol acetiltransferasa (<i>cat</i>) sin promotor, Amp ^R	(Brosius, 1984)
pphoH _{STm} -cat	Derivado del pKK232-8, contiene una fusión transcripcional de <i>phoH</i> -	(Martínez-Flores et al., 2016)

	<i>cat</i> de <i>S. Typhimurium</i> del nucleótido -653 al +416, Amp ^R	
p _{phoH_{Ec}} -cat	Derivado del pKK232-8, contiene una fusión transcripcional de <i>phoH-cat</i> de <i>E. coli</i> del nucleótido -406 al +406, Amp ^R	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
pP1 _{phoH_{STm}} -cat	Derivado del pKK232-8, contiene una fusión transcripcional de <i>phoH-cat</i> de <i>S. Typhimurium</i> del nucleótido -653 al +12, Amp ^R	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
pP2 _{phoH_{STm}} -cat	Derivado del pKK232-8, contiene una fusión transcripcional de <i>phoH-cat</i> de <i>S. Typhimurium</i> del nucleótido -5 al +416, Amp ^R	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
pP1 _{phoH_{STm}} -248+12-cat	Derivado del pKK232-8, contiene una fusión transcripcional de <i>phoH-cat</i> de <i>S. Typhimurium</i> del nucleótido -248 al +12, Amp ^R	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
pP1 _{phoH_{STm}} -67+3-cat	Derivado del pKK232-8, contiene una fusión transcripcional de <i>phoH-cat</i> de <i>S. Typhimurium</i> del nucleótido -67 al +3, Amp ^R	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
p _{phoH_{HilDmut}} -cat	Derivada de p _{phoH_{STm}} -cat, contiene mutaciones en el sitio de unión predicho de HilD, Amp ^R	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
p _{phoH_{P1mut}} -cat	Derivada de p _{phoH_{STm}} -cat, contiene mutaciones en el promotor P1, Amp ^R	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
p _{pstS_{STm}} -cat	Derivado del pKK232-8, contiene una fusión transcripcional de <i>pstS-cat</i> de <i>S. Typhimurium</i> del nucleótido -232 al +352	(Valdespino-Díaz et al., 2022)
pBAD _{MycHisC}	Vector de expresión para construir fusiones MycHis en el extremo C-	Invitrogen

	terminal, bajo un promotor inducible por arabinosa, Amp ^R	
pBAD-HilD1	Derivado de pBADMycHis, expresa a HilD-MycHis bajo un promotor inducible por arabinosa, Amp ^R	(Martínez et al., 2011)
pMPM-K6Ω	Vector de clonación derivado del p15A, contiene un promotor inducible por arabinosa, Km ^R	(Mayer, 1995)
pK6-HilD	Derivado del pMPM-K6Ω, expresa a HilD bajo un promotor inducible por arabinosa, Km ^R	(Martínez-Flores et al., 2016)
pMAL-HilD1	Derivado del pMAL-c2X, expresa a MBP-HilD a partir del promotor <i>lac</i> , Amp ^R	(Bustamante et al., 2008)
pBAD-H-NS-FH	Derivado del pBADMycHisC, expresa a H-NS-FH a partir de un promotor inducible por arabinosa, Amp ^R	(Banda et al., 2018)
pKD46	Derivado del pINT-ts, expresa la recombinasa del fago λ Rojo a partir de un promotor inducible por arabinosa, Amp ^R	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD4	Plásmido templado derivado del pANTsγ, contiene un casete de kanamicina para la recombinación mediante el sistema del fago λ Rojo, Amp ^R	(Datsenko and Wanner, 2000)
pSUB11	Plásmido templado derivado del pGP704 para etiquetar con el epítipo 3XFLAG	(Uzzau et al., 2001)
pFLP3	Derivado del pFLP2, expresa la recombinasa de levadura Flp, Amp ^R , Tet ^R	(Choi et al., 2005)

pyobH _{STm} -cat	Derivado del pKK232-8, contiene una fusión transcripcional de <i>yobH-cat</i> de <i>S. Typhimurium</i> del nucleótido -193 al +113, Amp ^R	(Banda et al., 2019a)
pyobH _{STm-mut} -cat	Derivada de yobH _{STm} -cat, contiene mutaciones en el sitio de unión de SprB, Amp ^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
pyobH _{STm} -193+10-cat	Derivado del pKK232-8, contiene una fusión transcripcional de <i>yobH-cat</i> de <i>S. Typhimurium</i> del nucleótido -193 al +10, Amp ^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
pyobH _{STm} -61+10-cat	Derivado del pKK232-8, contiene una fusión transcripcional de <i>yobH-cat</i> de <i>S. Typhimurium</i> del nucleótido -61 al +10, Amp ^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
pyobH _{STm} -61+10 _{mut} -cat	Derivada de yobH _{STm} -cat-61+10, contiene mutaciones en el sitio de unión de SprB, Amp ^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
pyobH _{STm} -33+10-cat	Derivado del pKK232-8, contiene una fusión transcripcional de <i>yobH-cat</i> de <i>S. Typhimurium</i> del nucleótido -33 al +10, Amp ^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
pyobH _{Ec} -cat	Derivado del pKK232-8, contiene una fusión transcripcional de <i>yobH-cat</i> de <i>E. coli</i> K-12 del nucleótido -195 al +116, Amp ^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
pyobH _{Ec-mut} -cat	Derivada de yobH _{Ec} -cat _{mut} , contiene mutaciones en el sitio de unión de SprB, Amp ^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
pyobH _{Ec} -61+10-cat	Derivado del pKK232-8, contiene una fusión transcripcional de <i>yobH-cat</i> de <i>E. coli</i> K-12 del nucleótido -61 al +10, Amp ^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)

pYobH _{Ec} -61+10 _{mut} -cat	Derivada de yobH _{Ec} -cat-61+10 contiene mutaciones en el sitio de unión de SprB, Amp ^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
pK6-SprB	Derivado del pMPM-K6Ω, expresa a SprB bajo un promotor inducible por arabinosa, Km ^R	(Banda et al., 2019a)
p2795	Derivado del pBluescript SK+, contiene <i>aph</i> FRT, Amp ^R , Km ^R	(Husseiny and Hensel, 2005)
p2795-YobH _{STm} -FLAG	Derivado de p2795, contiene los genes <i>yobH_{STm}::3XFLAG</i> y <i>aph</i> flanqueados por FRT's, Amp ^R , Km ^R	(Banda et al., 2019a)
p2795-YobH _{Ec} -FLAG	Derivado de p2795, contiene los genes <i>yobH_{Ec}::3XFLAG</i> y <i>aph</i> flanqueados por FRT's, Amp ^R , Km ^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
p2795-YobH _{STm} _mut-FLAG	Derivado de p2795, contiene los genes <i>yobH_{STm}_mut::3XFLAG</i> y <i>aph</i> flanqueados por FRT's, Amp ^R , Km ^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
pGEN-luxCDABE	Derivado de p15A, contiene el operón <i>luxCDABE</i> corriente abajo del promotor sintético constitutivo <i>em7</i> , Amp ^R	(Lane et al., 2007)
pYobH-lux	Derivado de pGEN-luxCDABE, contiene una fusión transcripcional <i>yobH-lux</i> de <i>S. Typhimurium</i> del nucleótido -193 al +113, Amp ^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
pWSK129	Vector de clonación, <i>ori</i> pSC101, Km ^R	(Wang and Kushner, 1991)
pPsprB-sprB	Derivado de pWSK129, expresa a SprB a partir del promotor nativo de <i>sprB</i> , Km ^R	Valdespino-Díaz et al., 2022 (no publicado)
pfdnG _{STm} -cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>fdnG-cat</i> de <i>S.</i>	Deyanira Pérez

	Typhimurium del nucleótido -419 al +198, Amp ^R	
pfdnG _{E_c} -cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>fdnG-cat</i> de <i>E. coli</i> del nucleótido -423 al +149, Amp ^R	Este trabajo

*Las coordenadas de las fusiones transcripcionales de *phoH* al gen *cat* se indican con respecto al sitio de inicio transcripcional del promotor P1 del gen. Amp^R, resistencia a ampicilina; Km^R, resistencia a la kanamicina; Stp^R, resistencia a la estreptomycinina; Tet^R, resistencia a tetraciclina.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia (5' – 3')*	Gen blanco	Modificación
Construcción de fusiones transcripcionales a <i>cat</i>			
phoH-Fw	CGAGGATCCAATATGGCTGGCTGGATC TG	<i>phoH</i> _{STm}	BamHI
phoH-Rv14	CGAAAGCTTGTCAGTCTCTTACAGAAA GATTAC	<i>phoH</i> _{STm}	HindIII
phoH-Fw15	CGAGGATCCTGTAAAGAGACTGACAAT GACGC	<i>phoH</i> _{STm}	BamHI
phoH-Rv	CGAAAGCTTCCATGGATAGCACCTTGA GT	<i>phoH</i> _{STm}	HindIII
phoH-Fw27	CGAGGATCCTGACGCAATAGAGTAAT GACAAA	<i>phoH</i> _{STm}	BamHI
phoH-Fw37	GATCCCCCGCAGTAGCTAATGATTATC TTTTTTAGTCTCCTGCCGATGAAATAA TCGTGTAATCTTTCTGTAAGAA	<i>phoH</i> _{STm}	
phoH-Rv38	AGCTTTCTTACAGAAAGATTACACGAT TATTCATCGGCAGGAGACTAAAAAA GATAATCATTAGCTACTGCGGGG	<i>phoH</i> _{STm}	
phoH-Fw79	CAGCATTAAATACCCGCAGTAGAAAGC ACACAGCTTTTTTAGTCTCCTGCCGAT G	<i>phoH</i> _{STm}	

phoH-Rv80	CATCGGCAGGAGACTAAAAAAGCTGT GTGCTTTCTACTGCGGGTATTAATGCT G	<i>phoH_{STm}</i>	
phoH-Fw83	CTGCCGATGAAATAATCGTGCGGCTCT TCTGTAAGAGACTGACAATG	<i>phoH_{STm}</i>	
phoH-Rv84	CATTGTCAGTCTCTTACAGAAGAGCCG CACGATTATTTTCATCGGCAG	<i>phoH_{STm}</i>	
SL1770-FW22	CCTGGATCCACAGCAACAGGCATACTA C	<i>yobH_{STm}</i>	BamHI
SL1770-RV11	GTTAAGCTTACTTCCCACCAGGATGCC	<i>yobH_{STm}</i>	HindIII
grhD2-FW45	CTGTAGCGGCATTATATGTTTTTAAAG GCAGTTCACTTGTTTCAATCAATGTAC AC	<i>yobH_{STm}</i>	
grhD2-RV46	GTGTACATTGATTGAAACAAGTGA ACTGCCTTTAAAAACATATAATGCCGCTAC AG	<i>yobH_{STm}</i>	
SL1770-FW25	CGAGGATCCCATTATATGTTTTTAGGA ATGATTCA	<i>yobH_{STm}</i>	BamHI
SL1770-RV26	CGAAAGCTTTTTTTAGTTAGAATAAGA GTAGCGT	<i>yobH_{STm}</i>	HindIII
SL1770-FW33	GATCCCATTATATGTTTTTAAAGGCAG TTCAGTTGTTTCAATCAATGTACACGC TACTCTTATTCTAACTAAAAAA	<i>yobH_{STm}</i>	
SL1770-RV34	AGCTTTTTTTAGTTAGAATAAGAGTAG CGTGTACATTGATTGAAACAAGTGAAC TGCCTTTAAAAACATATAATGG	<i>yobH_{STm}</i>	
SL1770-FW29	GATCCTGTTTCAATCAATGTACACGCT ACTCTTATTCTAACTAAAAAA	<i>yobH_{STm}</i>	
SL1770-RV30	AGCTTTTTTTAGTTAGAATAAGAGTAG CGTGTACATTGATTGAAACAG	<i>yobH_{STm}</i>	
SL1770Ec-FW93	CGAGGATCCCAAAGCAGCAAGCAAGC CAAC	<i>yobH_{Ec}</i>	BamHI

SL1770Ec-RV94	CGAAAGCTTCTTTGCTTCCAATCAAAA CGCC	<i>yobH_{Ec}</i>	HindIII
yobH-FW47	CTATGTCGATATTCGTGCTTTTTCAAG GCAGGTCGCTTGCTTCAGCGCATAT	<i>yobH_{Ec}</i>	
yobH-RV48	ATATGCGCTGAAGCAAGCGACCTGCCT TGAAAAAGCACGAATATCGACATAG	<i>yobH_{Ec}</i>	
yobH-FW49	GATCCTATTCGTGCTTTTTCGGAATGA GTCGCTTGCTTCAGCGCATATTGCCGC TACGATTAAGCGAACATAAAAA	<i>yobH_{Ec}</i>	
yobH-RV50	AGCTTTTTTATGTTTCGCTTAATCGTAGC GGCAATATGCGCTGAAGCAAGCGACT CATTCCGAAAAAGCACGAATAG	<i>yobH_{Ec}</i>	
yobH-FW53	GATCCTATTCGTGCTTTTTCAAGGCAG GTCGCTTCTTCAGCGCATATTGCCGCT ACGATTAAGCGAACATAAAAA	<i>yobH_{Ec}</i>	
yobH-RV54	AGCTTTTTTATGTTTCGCTTAATCGTAGC GGCAATATGCGCTGAAGCAAGCGACC TGCCTTGAAAAAGCACGAATAG	<i>yobH_{Ec}</i>	
fdnG-Fw	CGAGGATCCTGACAAACAGTACGCTG CCT	<i>fdnG_{STm}</i>	BamHI
fdnG-Rv	CGAAAGCTTAGCTTATAGTTTCGCGCC TG	<i>fdnG_{STm}</i>	HindIII
fdnGEc-Fw63	CAGGGATCCTGACGAATAACAGACTC CCGG	<i>fdnG_{Ec}</i>	BamHI
fdnGEc-Rv64	CGAAAGCTTAATTTGTAGTTTCGCGCC TGAG	<i>fdnG_{Ec}</i>	HindIII
Construcción de fusiones transcripcionales a <i>lux</i>			
yobH-luxF	CCTGGATCCACAGCAACAGGCATACTA C	<i>yobH_{STm}</i>	BamHI
yobH-luxR	GTTTACGTA ^{ACTTCCCACCAGGATGCC}	<i>yobH_{STm}</i>	SnaBI
Clonaje de genes			
SL1770-FW22	CCTGGATCCACAGCAACAGGCATACTA C	<i>yobH_{STm}</i>	BamHI

1770-SalIRv	GGAGTCGACCGTAAAAGTAGATAATA TCTGTCG	<i>yobH_{STm}</i>	Sall
yobH-FBamHI	CTGGGATCCTGTACATCCTGATCGCAC ATC	<i>yobH_{Ec}</i>	BamHI
yobH-R2SalI	GAGGTCGACAACCTGTCGGAATATCA AACAG	<i>yobH_{Ec}</i>	Sall
sprB-sprB-F	CTGGTTCGACTTTCACAAGTCGCGACGA TGTG	<i>sprB</i>	Sall
sprB-sprB-R	CAGTCTAGAGCTCAACACATGGTCATA AAT	<i>sprB</i>	XbaI
Inserción de genes en el cromosoma			
SL1770-FW22	CCTGGATCCACAGCAACAGGCATACTA C	<i>yobH_{STm}</i>	
1770FLAG- H2P2-C	TTATGAACAACAGCCAATATAGGGGA ATTATTGGTGATAGTTTAATACGACTC ACTATAGGGCG	<i>yobH_{STm}</i>	
yobH-H1P1- RREc	TACCACCACGATGCCGAGAACGACCC ATCGAAATTTTTTCACTCCAATCTCCGT TTCACCTAC	<i>yobH_{Ec}</i>	
Delección de genes			
EyobHH1P1	GCGAACATAAAAAGAGAAGAGGTTGT AATGCGATTCATCATTGTAGGCTGGA GCTGCTTCG	<i>yobH_{Ec}</i>	
EyobHH2P2	GGTATTTATTGCCCTTAACCATTATCG ACCACGATATTGCTCATATGAATATCCT CCTTAG	<i>yobH_{Ec}</i>	
Etiquetado de genes con FLAG			
EyobHFLAG-F	TGCCCGCTGTTACGCAAAGCAATATC GTGGTCGATAATGGTGACTACAAAGACC ATGACGG	<i>yobH_{Ec}</i>	
EyobHFLAG-R	GAGTATTTTACTCAGGAGTGAGAATCT GGTATTTATTGCCCCATATGAATATCCT CCTTAG	<i>yobH_{Ec}</i>	

fdnGSFg-FW	GCCGGAATACAAAGCGTTTTTAGTTAA CATCGAGAAGGCGGACTACAAAGACCA <i>TGACGGT</i>	<i>fdnG_{STm}</i>	
fdnGSFg-RV	AATAATGTCCTGCGTTTCCATAGACAT ATGTTTCGCCTCCCCATATGAATATCCTCC <i>TTAGTTC</i>	<i>fdnG_{STm}</i>	
Caracterización de cepas mutantes y genes etiquetados con FLAG			
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT		
K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC		
Caracterización de fusiones transcripcionales a <i>cat</i>			
PKKSEQ1-VB	CAACGGTGGTATATCCAGTG		
PKKSEQ2-VB	GAGGCCCTTTCGTCTTCAAG		
Ensayos de retardo en gel			
phoH-Fw	CGAGGATCCAATATGGCTGGCTGGATC TG	<i>phoH_{STm}</i>	BamHI
phoH-Rv	CGAAAGCTTCCATGGATAGCACCTTGA GT	<i>phoH_{STm}</i>	HindIII
phoH-Rv14	CGAAAGCTTGTCAGTCTCTTACAGAAA GATTAC	<i>phoH_{STm}</i>	HindIII
phoH-Fw15	CGAGGATCCTGTAAGAGACTGACAAT GACGC	<i>phoH_{STm}</i>	BamHI
phoH-Fw17	CGAGGATCCAGCGATGGGAGAGAGGA CAC	<i>phoH_{STm}</i>	BamHI
phoH-Rv84	CATTGTCAGTCTCTTACAGAAGAGCCG CACGATTATTTTCATCGGCAG	<i>phoH_{STm}</i>	
phoH-Fw41	CGAGGATCCTGGATATGGGGTTGCTGT TTG	<i>phoH_{Ec}</i>	BamHI
phoH-Rv42	CGAAAGCTTCATGGAGAGCACCTTGA GTTG	<i>phoH_{Ec}</i>	HindIII

*Las letras subrayadas indican el respectivo sitio de la enzima de restricción en el oligonucleótido. Las secuencias correspondientes a los plásmidos templado pKD4 o pSUB11 (Tabla 2) están en cursiva.

8.1. Medios de cultivo

Los cultivos bacterianos se crecieron en medio LB, que contiene 0.1% triptona, 0.5 % extracto de levadura y 0.1% NaCl, ajustado a pH 7.5; y en MM-N (medio mínimo N), que contiene 5 mM KCl, 7.5 mM (NH₄)₂SO₄, 0.5 mM K₂SO₄, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 μM MgCl₂, 0.1% casaminoácidos y KH₂PO₄ a 640 μM o 64 μM para recrear condiciones de alto o bajo fósforo inorgánico respectivamente. Cuando fue necesario, los medio fueron suplementados con los siguientes antibióticos: ampicilina (200 μg/ml), estreptomomicina (100 μg/ml), kanamicina (20 μg/ml) o tetraciclina (12 μg/ml).

8.2. Construcción de plásmidos

En las Tablas 2 y 3 se indican los plásmidos utilizados y construidos, así como los oligonucleótidos utilizados. Para construir los plásmidos pP1phoH_{STm}-cat, pP2phoH_{STm}-cat y pphoH_{STm}-248+12-cat, la secuencia corriente arriba correspondiente de *phoH*_{STm} (-653 a +12; -5 a +416 y -248 a +12, respectivamente, con respecto al promotor P1) se amplificó por PCR con los pares de oligonucleótidos phoH-Fw/phoH-Rv14, phoH-Fw15/phoH-Rv y phoH-Fw27/phoH-Rv14 respectivamente, utilizando el DNA cromosómico de la cepa WT *S. Typhimurium* SL1344 como templado. Los plásmidos pyobH_{STm}-cat-193+10 y pyobH_{STm}-cat-61+10 se construyeron mediante amplificación por PCR de las secuencias de nucleótidos determinadas del gen *yobH*_{STm} con los pares de oligonucleótidos SL1770-FW22/SL1770-RV26 y SL1770-FW25/SL1770-RV26 respectivamente; usando DNA cromosómico de la cepa WT *S. Typhimurium* como templado. El plásmido pyobH_{Ec}-cat se construyó mediante amplificación por PCR de la secuencia de nucleótidos -195/+116 del gen *yobH*_{Ec} con el par de oligonucleótidos SL1770Ec-FW93/SL1770Ec-RV94 utilizando DNA cromosómico de la cepa WT *E. coli* K-12 MG1655 como templado. Todos los productos de PCR anteriores se

purificaron y digirieron con las enzimas BamHI y HindIII y se clonaron en los mismos sitios de restricción del vector pKK232-8.

Los plásmidos pphoH_{HilDmut}-cat y pphoH_{P1mut}-cat, que contienen mutaciones en el sitio de unión a HilD predicho y el promotor P1 respectivamente, se construyeron mediante PCRs solapados utilizando el DNA cromosómico de la cepa WT *S. Typhimurium* SL1344 como templado. En primer lugar, se obtuvieron dos productos de PCR para cada plásmido, con los pares de oligonucleótidos phoH-Fw/phoH-Rv80 y phoH-Fw79/phoH-Rv para pphoH_{HilDmut}-cat, y con los pares de oligonucleótidos phoH-Fw/phoH-Rv84 y phoH-Fw83/phoH-Rv para pphoH_{P1mut}-cat. Los productos de PCR se purificaron y los correspondientes a cada plásmido se mezclaron y utilizaron como templado para un segundo PCR con los oligonucleótidos externos phoH-Fw y phoH-Rv. Los productos de PCR resultantes se purificaron y digirieron con las enzimas BamHI y HindIII y se clonaron en los mismos sitios de restricción del vector pKK232-8. Los plásmidos pyobH_{STm}_mut-cat y pyobH_{Ec}_mut-cat que contienen mutaciones en el sitio de unión de SprB se construyeron mediante PCRs solapados utilizando DNA cromosómico de las cepas DTM128 (*yobH_{STm}::3XFLAG*) de *S. Typhimurium* y DTM160 (*yobH_{Ec}::3XFLAG*) de *E. coli* K-12 como templado, respectivamente. Primero, los productos individuales se amplificaron por PCR con los pares de oligonucleótidos SL1770-FW22/grhD2-RV46 y grhD2-FW45/1770-SalIRv para pyobH_{STm}_mut-cat; y SL1770Ec-FW93/yobH-RV48 y yobH-FW47/yobHR2-SalI para pyobH_{Ec}_mut-cat. Los productos de PCR se purificaron, mezclaron y usaron como templado para un segundo PCR con los oligonucleótidos externos SL1770-FW22/1770-SalIRv para pyobH_{STm}_mut-cat y SL1770Ec-FW93/yobHR2-SalI para pyobH_{Ec}_mut-cat. Luego, los fragmentos resultantes se purificaron y usaron como templado en una nueva PCR con los pares de oligonucleótidos SL1770-FW22/SL1770-RV11 y SL1770Ec-FW93/SL1770Ec-RV94 para pyobH_{STm}_mut-cat y pyobH_{Ec}_mut-cat respectivamente. Estos productos de PCR se purificaron y digirieron con las enzimas BamHI y HindIII y se clonaron en los mismos sitios de restricción del vector pKK232-8.

El plásmido pphoH_{STm}-67+3-cat se construyó con los oligonucleótidos autocomplementarios phoH-Fw37 y phoH-Rv38. Estos oligonucleótidos se mezclaron en una proporción 1:1, se calentaron a 95 °C durante 10 min y luego se enfriaron a temperatura ambiente durante 1 h. El producto de doble cadena obtenido contiene extremos cohesivos para su clonación en los sitios de restricción BamHI y HindIII del vector pKK232-8. Los plásmidos pyobH_{STm}-cat-33+10, pyobH_{STm}-cat-61+10mut, pyobH_{Ec}-cat-61+10 y pyobH_{Ec}-cat-61+10mut se construyeron mediante los pares de oligonucleótidos autocomplementarios SL1770-FW29/SL1770-RV30, SL1770-FW33/SL1770-RV34, yobH-FW49/yobH-RV50 y yobH-FW53/yobH-RV54 respectivamente, utilizando la misma metodología descrita anteriormente. Los pares de oligonucleótidos utilizados para generar pyobH_{STm}-cat-61+10mut y pyobH_{Ec}-cat-61+10mut contienen mutaciones en el sitio de unión de SprB.

El plásmido p2795-YobH_{Ec}-FLAG se construyó mediante amplificación por PCR del gen *yobH_{Ec}::3XFLAG* con el par de oligonucleótidos yobH-FBamHI/yobH-R2Sall y DNA cromosómico de la cepa DTM160 (*yobH_{Ec}::3XFLAG*) de *E. coli* K-12 como templado. El producto PCR purificado se digirió con las enzimas Sall y BamHI y se clonó en los mismos sitios de restricción del vector p2795. El plásmido p2795-YobH_{STm}-mut-FLAG, que contiene mutaciones en el sitio de unión de SprB, se construyó mediante PCR solapado usando DNA cromosómico de la cepa DTM128 (*yobH_{STm}::3XFLAG*) de *S. Typhimurium* como templado. Primero, los productos individuales se amplificaron por PCR con los pares de oligonucleótidos SL1770-FW22/grhD2-RV46 y grhD2-FW45/1770-SalIRv. Los productos de PCR se purificaron, mezclaron y usaron como templado para una segunda PCR con los oligonucleótidos externos SL1770-FW22 y 1770-SalIRv. Luego, el fragmento resultante se purificó, se digirió con las enzimas BamHI y Sall y se clonó en los mismos sitios de restricción del vector p2795.

Para construir el plásmido pyobH-lux (Tabla 2), se reemplazó el promotor *em7* del plásmido pGEN-luxCDABE (plásmido Addgene # 44918) con la respectiva región reguladora de *yobH_{STm}*. La región reguladora de *yobH_{STm}* se amplificó por PCR con el par de oligonucleótidos yobH-luxF/yobH-

luxR. Los productos de PCR se digirieron con las enzimas BamHI y SnaBI y luego se clonaron en los mismos sitios de restricción del pGEN-luxCDABE. Para construir el plásmido psprB-sprB se amplificó por PCR la secuencia que abarca el gen estructural *sprB* junto a su región reguladora, con el par de oligonucleótidos sprB-sprB-F/sprB-sprB-R, utilizando el DNA cromosómico de la cepa WT *S. Typhimurium* SL1344 como templado. El producto de PCR fue digerido con las enzimas SalI y XbaI y clonado en los mismos sitios de restricción del vector de bajo número de copias pWSK129.

En todos los casos descritos anteriormente, para las reacciones de ligación se cuantificó la concentración de DNA de los fragmentos a insertar y vector mediante un “NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer” (Thermo scientific). El producto de PCR y el vector se ligaron poniéndolos en la reacción de ligación en una proporción aproximada de 5:1 molar. Esta reacción se incubó a 22°C durante 1 h y se utilizaron de 2 a 3 µl para transformar la cepa *E. coli* DH10β. Para confirmar que la clonación del fragmento de DNA en el vector se llevó a cabo, se purificaron plásmidos de varias transformantes de *E. coli* DH10β con el kit Zyppy Plasmid Miniprep (ZYMO RESEARCH), mismos que fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%. Aquellos 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 se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM para obtener y verificar la secuencia de nucleótidos.

8.3.Preparación de células electrocompetentes

Las diferentes cepas de interés se cultivaron en 5 ml de LB adicionado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al otro día, se emplearon 1 ml de estos cultivos para inocular un matraz de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo SOB adicionado con los mismos antibióticos. Estos cultivos se incubaron durante 2 a 3 h a 37°C a 200

rpm, hasta que alcanzaron una D.O.600nm de 0.6 a 0.8. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron por 8 min a 8,000 rpm a 4°C en tubos Nalgene, se desechó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 30 ml de agua MQ fría estéril y se centrifugó en las mismas condiciones. Después, el sobrenadante se desechó, se resuspendió la pastilla en 30 ml de glicerol al 10% estéril frío y se procedió a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 500 µl de glicerol al 10% estéril frío.

8.4.Electroporación

Se mezclaron 50 µl de células electrocompetentes con 5 µl de DNA plasmídico. Esta mezcla se colocó en una celda de electroporación fría (BIORAD) y se le dio un pulso eléctrico de 2.5 kV durante 5.5 ms usando un electroporador “*E. coli pulser*” (BIORAD). Posteriormente, se agregó a la celda 1 ml de medio de cultivo SOC y se mezcló, después se transfirió el contenido a un tubo de ensayo y se incubó durante 1 h a 37°C con agitación a 200 rpm. Finalmente, se sembraron entre 100-200 µl del cultivo en cajas Petri con medio LB solidificado conteniendo agar al 1.5% con los antibióticos correspondientes e incubándose a 37°C durante 16 h aproximadamente.

8.5.Construcción de cepas mutantes

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

bajo el control de un promotor inducible por arabinosa en un plásmido de bajo número de copias (pKD46) (Tabla 2).

Inicialmente, se amplificó mediante PCR el gen cuyo producto confiere resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4, empleando los oligonucleótidos H1P1 y H2P2 correspondientes al gen a eliminar (Tabla 3). Se prepararon 5 mezclas de reacción de PCR y los productos se concentraron en uno solo. Para esto, se agregaron 100 μ l de acetato de amonio pH 7.8, 300 μ l de fenol y 300 μ l de cloroformo alcohol isoamílico, se mezcló y se centrifugó durante 5 min a 14,000 rpm. Después se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó 1 ml de etanol absoluto, se agitó y se dejó precipitar durante 1 h a -70°C . Transcurrido ese tiempo, se centrifugó durante 30 min a 14,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70%. Después se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en 7 μ l de agua. Se utilizó 1 μ l de este producto para una electroforesis en gel de agarosa al 1% con la finalidad de revisar el producto concentrado.

Por otra parte, se puso un preinóculo de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene el plásmido pKD46 en una caja de LB adicionada con ampicilina y se incubó durante toda la noche a 30°C . Al otro día se inocularon 40 colonias en 25 ml de SOB suplementado con 2.5 ml de L-arabinosa 1M y ampicilina, y se incubaron a 30°C con agitación hasta una D.O.600nm de 0.6. Estas células fueron preparadas para una transformación, para lo cual se centrifugaron durante 10 min a 8,000 rpm a 4°C , se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 ml de agua fría estéril. Posteriormente se centrifugó durante 5 min a 8,000 rpm a 4°C , se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de agua fría estéril, se repitió este paso de lavado 2 veces para finalmente resuspender la pastilla en 100 μ l de agua fría estéril. 50 μ l de estas células electrocompetentes fueron transformadas por electroporación con 3 μ l del producto de PCR concentrado y se incubaron en 1 ml de medio SOC durante 3 h a 30°C . Posteriormente se sembraron 200 μ l en agar LB adicionado con kanamicina y se incubaron a 42°C durante toda la noche. Las transformantes que se obtuvieron se

resembraron en agar LB adicionado con kanamicina a 42°C con el fin de separar colonias. Finalmente se sembraron en medio LB adicionado con estreptomycin, kanamicina o ampicilina, con el fin de analizar resistencia o sensibilidad a los antibióticos. Para la caracterización de las mutantes con aquellas colonias que fueron resistentes a kanamicina y sensibles a ampicilina se realizaron distintos PCR con varios juegos de oligonucleótidos (Tabla 3) que permiten amplificar regiones del gen de resistencia a kanamicina y/o las regiones que los flanquean. Todas las cepas mutantes fueron verificadas mediante secuenciación de los productos de PCR.

Para la construcción de las cepas mutantes complementadas en el cromosoma, se siguió la metodología descrita anteriormente, pero con los siguientes cambios:

En el paso de la amplificación mediante PCR del gen de resistencia a kanamicina, éste se amplificó junto con el gen que se quiso insertar, utilizando como molde el plásmido p2795 que contiene al gen a insertar. Por otro parte, la cepa de *S. Typhimurium* que se utilizó para preparar células competentes y transformarlas, fue la cepa mutante a complementar conteniendo el plásmido pKD46.

8.6. Construcción de cepas que expresan genes etiquetados con el epítipo FLAG

Para etiquetar al gen cromosomal deseado con el epítipo FLAG (3XFLAG), se empleó una modificación del sistema del fago λ Rojo para la mutagénesis, descrito previamente (Datsenko and Wanner, 2000). Esta modificación consiste en agregar en fase el epítipo FLAG al final del gen cromosomal que se requiere etiquetar, sustituyendo de esta manera el codón de término (Uzzau et al., 2001). Para esto se utilizaron oligonucleótidos con homología a las regiones que flanquean el codón de término del gen, y que a su vez también tienen homología con regiones del plásmido pSUB11, que se usó como molde para amplificar el epítipo 3XFLAG junto con el gen de resistencia a kanamicina (3XFLAG-km). Una vez obtenidos los productos de PCR, se procedió de la misma manera que en el apartado “Construcción de cepas mutantes”. Cuando el gen a etiquetar era de *E. coli*, se utilizó la cepa

de *E. coli* MG1655 que contiene el plásmido pKD46. Al final se seleccionaron aquellas cepas cuyos productos de PCR correspondían al tamaño del epítipo 3XFLAG-km. Todas las cepas etiquetadas fueron verificadas mediante secuenciación de los productos de PCR.

8.7. Cultivos bacterianos para cuantificar la expresión de los genes

- Medio LB

Las cepas que contienen genes etiquetados con el epítipo de 3XFLAG o plásmidos que llevan las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* se cultivaron en 5 ml de medio LB adicionado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, se tomaron 500 µl de cada cultivo y se inocularon por cada cepa a evaluar 2 matraces de 250 ml con 50 ml de LB adicionado con los mismos antibióticos. Estos cultivos se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante 6 o 9 h según correspondiera. Se tomaron muestras de 1.5 ml de cultivo una vez transcurrido el tiempo de incubación para analizar la expresión de las diferentes fusiones transcripcionales o para la detección de proteínas por medio de Western blot. Posteriormente se procedió a centrifugar todas las muestras durante 2 min a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas obtenidas se procesaron como se indica en el apartado “Inmunodetección de proteínas mediante Western blot”. En cambio, cuando las pastillas se utilizaron para la cuantificación de la actividad de específica de CAT, éstas se lavaron con 800 µl de solución de lavado TDTT (Tris-HCl, pH 7.8 50 mM, y DL-ditiotreitol 30 µM), y después de centrifugar en las mismas condiciones que anteriormente, se desechó el sobrenadante. En caso de no utilizar las pastillas inmediatamente, se almacenaron a -20°C, de lo contrario, se resuspendieron en 500 µl de TDTT.

- Medio mínimo N (MM-N)

De igual forma que para la cuantificación de la expresión de los genes en medio LB, las cepas que contienen los plásmidos que llevan las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* se cultivaron

en 5 ml de medio LB adicionado con los antibióticos para los que tienen resistencia 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 lavaron con 1 ml de medio MM-N. Posteriormente las pastillas se resuspendieron en 500 µl de MM-N y con cada una de ellas se inocularon dos matraces con 50 ml de MM-N. Los cultivos se incubaron durante 16 h a 37°C en agitación a 200 rpm, hora a la cual se tomó una muestra de 3 ml, también midiéndose la densidad óptica de los cultivos a 600 nm. Las muestras se centrifugaron durante 2 min y se desechó el sobrenadante. Las pastillas obtenidas se procesaron como se indica en el apartado “Inmunodetección de proteínas mediante Western blot” o se lavaron con 800 µl de solución de lavado TDTT para la detección de la actividad específica CAT. En caso de no utilizar las pastillas inmediatamente, se almacenaron a -20°C, de lo contrario, se resuspendieron en 500 µl de TDTT.

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

La actividad de la enzima Cloranfenicol Acetil Transferasa fue medida usando una modificación de un método espectrofotométrico. Primero, las pastillas resuspendidas en TDTT fueron sonicadas durante 3 min en un sonicador “Vibra Cell”, con pulsos de 10 s y períodos de reposo de 10 entre cada pulso, obteniéndose un tiempo total de sonicación de 6 min. Posteriormente las muestras sonicadas fueron centrifugadas durante 15 min a 14,000 rpm y se transfirió el sobrenadante obtenido a tubos nuevos.

Para la cuantificación de las proteínas totales en los sobrenadantes obtenidos se utilizaron placas de cultivo celular de 96 pozos (Costar), donde se agregaron por duplicado 10 µl de cada muestra por pozo, utilizando como blanco 10 µl de TDTT. Después, se añadió a cada pozo 200 µl de una mezcla (50:1) de los reactivos A y B del estuche BCA “Protein Assay Reagent” (Pierce) y se incubó la placa

durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se calculó la concentración de proteínas totales mediante la lectura de la absorbancia a 562 nm en un lector automatizado de microplacas tipo CERES 900 C (Bio-Tek Instruments Inc.), utilizando el programa KC3. Los valores obtenidos se interpolaron en una curva estándar de concentraciones de la proteína ASB (de 0 a 1.5 mg/ml) previamente almacenada en dicho programa.

Para calcular la actividad enzimática de CAT, 5 µL de cada muestra fueron agregadas por duplicado en otra placa de cultivo celular de 96 pozos, seguido de 200 µl de una mezcla de reacción de Tris-HCl pH 7.8 0.1 M, DTNB (ácido 5, 5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico) Research Organics) 1 mM, acetil-CoA 0.1 mM (Pharmacia Biotech) y cloranfenicol 0.1 mM (Sigma). La actividad de CAT se determinó, inmediatamente después de agregarse la mezcla de reacción, utilizando el mismo lector de microplacas posicionado en el modo de cinética, tomándose lecturas de absorbancia a 405 nm cada 5 s durante 5 min de reacción.

8.9. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot

Muestras de aproximadamente 1 ml de cultivos, crecidos de acuerdo con lo descrito previamente en el apartado de “Cultivos bacterianos para cuantificar la expresión de genes”, se centrifugaron durante 2 min a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas de bacterias obtenidas fueron resuspendidas en 250 µl de amortiguador de carga SDS-PAGE 1X. Estas muestras se calentaron a 96 °C durante 5 min y se corrieron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%, usando amortiguador de corrida Tris-Glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0.1%). Este gel se utilizó para la transferencia de las proteínas 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 50 min a 15 V. Las membranas que contenían las proteínas transferidas fueron bloqueadas con leche desgrasada al 5% en

PBST (PBS 1X, Tween 20 0.03%) durante toda la noche. Posteriormente la membrana se incubó en agitación durante 2 h con el anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 (SIGMA) o el anticuerpo policlonal anti-GroEL (StressGen), diluidos en PBST 1:10,000 o 1:100,000, respectivamente. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó 3 veces durante 10 min con PBST en agitación. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón (1:10,000) o anti-conejo (1:10,000) (PIERCE) para detectar al anticuerpo anti-FLAG o anti-GroEL, respectivamente. Las membranas se mantuvieron en agitación durante 1 h. Se realizaron de nuevo 3 lavados de 10 min cada uno con PBST en agitación. A continuación, se agregó una mezcla 1:1 de los reactivos para revelado “enhanced luminol reagent” y “oxidizing reagent” del estuche comercial para revelado “Western Lightening Chemiluminiscense Reagent Plus” (Perkin Elmer Life Sciences) y se mantuvieron en agitación durante 1 min. Finalmente, las membranas se expusieron en películas radiográficas (KODAK-Omat-LS-film).

8.10. Ensayos de retardo en gel (EMSA's, Electrophoretic Mobility Shift Assays)

Para los EMSAs con MBP-HilD o H-NS-FH, las regiones reguladoras de los genes a evaluar fueron amplificadas mediante PCR usando DNA cromosomal de *S. Typhimurium* SL1344 o *E. coli* MG1655 (Tabla 1) y los respectivos oligonucleótidos específicos (Tabla 3). Los productos de PCR fueron purificados usando el estuche comercial DNA Clean & Concentrator kit (ZYMO RESARCH). Para los EMSAs no competitivos, aproximadamente 100 ng de cada uno de los diferentes fragmentos de DNA se incubaron con concentraciones crecientes de la proteína purificada previamente MBP-HilD o H-NS-FH (Bustamante et al., 2008), en un volumen total de 20 μ l. Las interacciones se realizaron a temperatura ambiente durante 20 min. Para los EMSAs competitivos entre HilD y H-NS, primero se incubaron los 100 ng del fragmento de DNA con una concentración constante de la proteína H-NS-FH durante 15 min y transcurrido ese tiempo, se añadieron concentraciones crecientes de la proteína MBP-HilD, y las reacciones se incubaron durante otros 20 min. Las reacciones de retardo fueron

realizadas en el buffer de unión que contiene 10 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 5% glicerol y 10 µg/ml ASB. Los complejos proteína-DNA se separaron en un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones no desnaturizantes en amortiguador de corrida Tris-boratos-EDTA 0.5X. Para la visualización de los complejos DNA-proteína, los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml y se visualizaron en un transiluminador con luz UV de onda corta (Alpha-Imager UV transiluminator Innotech Corp.).

8.11. Ensayo de invasión a células HeLa

La invasión en células HeLa (células epiteliales cervicales humanas, ATCC) se realizó por medio de un ensayo de protección a gentamicina como se ha descrito previamente (Ibarra et al., 2010; Pérez-Morales et al., 2017). Para esto, las células HeLa se crecieron en medio DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”, GIBCO 12100-046), suplementado con una solución de piruvato de sodio 10 mM (SIGMA S8636), L-glutamina 20 mM (GIBCO 25030-081) y 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (ByProductos 13001), a 37°C, 5% CO₂. Para los ensayos, se sembraron 1 x 10⁵ células/pozo (1 ml/pozo) en placas de 24 pozos (Costar 3524, Corning Incorporated ®) de 20 a 24 h antes de la infección para permitir su adhesión. Se colocaron las placas en una incubadora humidificada a 37°C, 5% de CO₂. Para la preparación de las bacterias, se estriaron las cepas a evaluar en cajas de LB con los antibióticos adecuados para obtener colonias aisladas. Se prepararon preinóculos a partir de una sola colonia de cada cepa crecidas en 3 ml de LB con los antibióticos adecuados y se incubaron durante 16-18 h a 37°C en agitación a 200 rpm. Transcurrido ese tiempo, se subcultivaron 600 µl de los preinóculos en 20 ml de LB sin antibióticos y se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm hasta alcanzar una D.O.600nm de 0.6-0.7 (dilución 1:5). Una vez que las bacterias alcanzaron la D.O. deseada, se centrifugó 1 ml de cada cultivo durante 2 min a 8,000 x g. Enseguida se removieron cuidadosamente 900 µl del sobrenadante sin deshacer la pastilla de bacterias. Después se

resuspendieron las pastillas en 900 μ l de PBS 1X estéril y se realizó una dilución 1:10 en DMEM para infectar las células HeLa. Posteriormente cada pozo conteniendo las monocapas de células HeLa se infectaron con 10 μ l de la dilución anterior y se movió la placa para mezclar (este fue el tiempo 0). Enseguida se incubó la placa a 37°C, 5% CO₂ durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, se retiró el DMEM de cada uno de los pozos y se lavaron las monocapas de células 2 veces adicionando 1 ml de PBS 1X estéril a cada pozo, agitando cuidadosamente la placa y retirando el PBS. Una vez removido el PBS, se adicionó a cada pozo 1 ml de DMEM precalentado a 37°C y se incubó la placa a 37°C, 5% CO₂ durante 20 min. Posteriormente, se removió el DMEM de cada pozo y se agregó 1 ml de DMEM suplementado con gentamicina (50 μ g/ml) para eliminar a las bacterias que no invadieron. Enseguida se incubó la placa a 37°C, 5% CO₂ durante 1 h. Después de ese tiempo, se lavaron las monocapas de células 1 vez adicionando a cada pozo 1 ml de PBS 1X estéril, agitando cuidadosamente la placa y removiendo el PBS. Enseguida se solubilizaron las monocapas de células adicionando 1 ml de solución de solubilización (deoxicolato de sodio al 0.2% en PBS 1X estéril) recién preparada y pipeteando la solución sobre las capas de células 3 veces. Inmediatamente se transfirió el contenido a tubos eppendorf estériles a partir de los cuales se realizaron diluciones seriales (1:10, 1:100 y 1:1,000) en PBS 1X estéril. Se plaquearon 10 μ l de cada dilución y de la solución directa sobre cajas Petri con LB conteniendo 100 μ g/ml de estreptomycin (5 repeticiones para obtener un promedio). Los inóculos iniciales también fueron diluidos de manera serial y se sembraron como se describió anteriormente. Las cajas se incubaron a 37°C y al siguiente día se contaron las colonias obtenidas. Los cálculos de las UFCs/ml se hicieron tomando en cuenta los factores de dilución.

8.12. Ensayo de adherencia a células HeLa

Se prepararon las monocapas de células HeLa en las placas de 24 pozos y los cultivos bacterianos de la misma manera que para el ensayo de invasión a células HeLa. Una vez que las

bacterias alcanzaron la D.O. deseada, se centrifugó 1 ml de cultivo durante 2 min a 8,000 x g. Enseguida se removieron cuidadosamente 900 µl del sobrenadante sin deshacer la pastilla de bacterias. Después se resuspendieron las pastillas en 900 µl de PBS 1X estéril. Posteriormente, cada pozo conteniendo las mononocapas de células HeLa en cultivo se infectaron con 10 µl de la solución de bacterias anterior y se movió la placa para mezclar (este fue el tiempo 0). Enseguida se incubó la placa a 37°C, 5% CO₂ durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, se retiró el DMEM de cada uno de los pozos y se lavaron las monocapas de células 4 veces adicionando 1 ml de PBS 1X estéril a cada pozo, agitando cuidadosamente la placa y retirando el PBS. Una vez removido el PBS se solubilizaron las monocapas de células, se realizaron diluciones seriales, se plaqueó y al siguiente día se contaron las UFCs/ml de igual manera que para el ensayo de invasión.

8.13. Experimentos de infección en ratones

La manipulación de los animales en este trabajo se llevó a cabo de acuerdo a los protocolos estandarizados aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de CICUAL-UNAM, por la Norma Oficial Mexicana NOM-062Z00-1999 (experimentos realizados con el gen *phoH*); y por el Consejo Canadiense de Cuidado de Animales, utilizando protocolos aprobados por el Consejo de Ética de Revisión de Animales de la Universidad McMaster bajo el Protocolo de Uso de Animales # 20-12-41 (ensayos realizados con *yobH*). Ratones BALB/c libres de patógenos (6 a 8 semanas de nacidos) fueron obtenidos de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM o de los Laboratorios Charles River, para los ensayos realizados con los genes *phoH* y *yobH*, respectivamente. Se les retiró el agua y alimento 4 h antes del tratamiento de los ratones con 50 mg de estreptomicina por administración orogástrica; luego se les proporcionó a los animales agua y comida *ad libitum*. Para la infección, cultivos de toda la noche de las cepas de *Salmonella* se diluyeron 1:100 en 5 ml de LB fresco y se incubaron a 37°C con agitación durante 3 h.

Después de 24 h del tratamiento con estreptomicina, nuevamente se les retiró el agua y alimentos 4 h antes de la infección de los ratones con 50 µl de una suspensión de bacterias de 1×10^8 UFCs/ml en PBS 1X, o de la administración de 50 µl de PBS 1X estéril (control). Un total de 12 ratones fueron inoculados por cada cepa bacteriana. Posteriormente, se les proporcionó a los animales agua y comida *ad libitum*.

Los ratones se sacrificaron con una sobredosis de los anestésicos Ketamina y Xilacina administrados vía intraperitoneal, en una campana de trabajo (Thermo-Scientific) y el íleon, el ciego, el colon y el bazo se homogeneizaron en PBS frío (los tejidos intestinales se enjuagaron primero con PBS para eliminar el contenido luminal), se diluyeron en serie y se sembraron en medio LB que contenía estreptomicina (100 µg/ml) o estreptomicina y kanamicina (100 µg/mL y 50 µg/mL, respectivamente) para la determinación de CFU totales.

- RT-qPCR para la detección de marcadores proinflamatorios inducidos por *yobH*

Se usó el reactivo Trizol (Ambien) para extraer RNA de los tejidos animales después de la infección. Brevemente, las muestras de tejido se homogeneizaron en 1 ml de Trizol (Invitrogen) para la lisis celular. El RNA se extrajo mediante separación con cloroformo (BioShop) siguiendo el protocolo del fabricante, se precipitó con isopropanol al 100 % (BioShop) y se lavó con etanol al 75 % (Sigma) antes del tratamiento con DNAasa I (kit Turbo DNA-free). La DNAasa I se inactivó con EDTA 2,5 mM y el RNA se resuspendió en agua DEPC. Para los experimentos de RT-qPCR, el cDNA se sintetizó a partir de RNA purificado utilizando qScript cDNA Supermix (Quantabio) y se diluyó 1:10 antes de su uso. El gen “housekeeping” *rplp0* se utilizó para la normalización; la RT-qPCR se realizó en un LightCycler 480 (Roche) con PerfeCTa SYBR Green Supermix (Quantabio). Las proporciones, normalizadas en peso, se calcularon en relación con los niveles de transcripción de *rplp0*.

- Experimento iVIS para la detección *in vivo* de la expresión de *yobH* en el intestino de ratones

Se adquirieron ratones hembra C57BL/6 de seis a diez semanas de edad de los Laboratorios Charles River. Los ratones se almacenaron en una instalación de barrera SPF de nivel de bioseguridad 2 en McMaster Central Animal Facility. Los ratones pretratados con estreptomicina fueron infectados con 1×10^9 CFU de *Salmonella* como se describió anteriormente. Posteriormente, los ratones se anestesiaron con isofluorano al 3,5% transportado en oxígeno al 1% y se tomaron imágenes dorsalmente en un espectro iVIS (PerkinElmer). Se capturaron imágenes luminiscentes cada hora durante 6 h y se cuantificó la luminiscencia abdominal total en cada punto de tiempo. Se utilizaron 2 ratones por cada cepa bacteriana y el experimento se repitió una vez para un total de 4 ratones por cepa.

8.14. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA), utilizando análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, o la prueba *t* de Student (no apareada). Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

9. RESULTADOS

9.1. Adaptación de la regulación transcripcional de *phoH* mediada por HilD

9.1.1. El gen *phoH* de *S. Typhimurium*, pero no el de *E. coli* K-12, es activado por HilD en condiciones inductoras de SPI-1

El gen *phoH* codifica para una proteína (PhoH) con actividad ATPasa, de la cual se pueden encontrar ortólogos en una amplia gama de bacterias patógenas y no patógenas, incluyendo a *Salmonella* y *E. coli* K-12 (Kazakov et al., 2003; Martínez-Flores et al., 2016). De hecho, el gen estructural *phoH* y su proteína codificada, PhoH, comparten identidades del 82% y 95%, respectivamente, entre *S. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* MG1655. Por el contrario, las secuencias intergénicas corriente arriba de *phoH* muestran una menor identidad (54%) y el contexto genómico no está conservado entre estas dos bacterias (Fig. 4A). Por lo tanto, nos preguntamos si, además de la ganancia de HilD por *S. Typhimurium*, también fue necesaria una diferenciación de la secuencia reguladora de *phoH* en *S. Typhimurium* para que se adaptara su regulación por HilD. Para abordar esta pregunta, analizamos la expresión del gen *phoH* de *S. Typhimurium* SL1344 (*phoH_{STm}*) y de *E. coli* MG1655 (*phoH_{Ec}*) en cepas de *S. Typhimurium* y *E. coli* que expresan o no a HilD y se cultivaron en condiciones inductoras de SPI-1 (LB a 37°C). En primer lugar, construimos la fusión transcripcional *phoH_{Ec}-cat* (que lleva la secuencia intergénica completa corriente arriba de *phoH_{Ec}*), que es equivalente a la fusión transcripcional *phoH_{STm}-cat* que usamos anteriormente para mostrar la regulación del gen *phoH_{STm}* por HilD (Martínez-Flores et al., 2016) (Fig. 4B) (Tabla 2). A continuación, se cuantificó la expresión de ambas fusiones en la cepa silvestre (WT) *S. Typhimurium* SL1344 y su mutante derivada Δ *hilD*, así como en la cepa WT *E. coli* MC4100, en presencia del plásmido pK6-HilD que expresa

HilD o el vector pMPM-K6. De acuerdo con nuestro estudio anterior (Martínez-Flores et al., 2016), la expresión de la fusión *phoH_{STm}-cat* disminuyó significativamente en el mutante $\Delta hilD$ +vector y en la

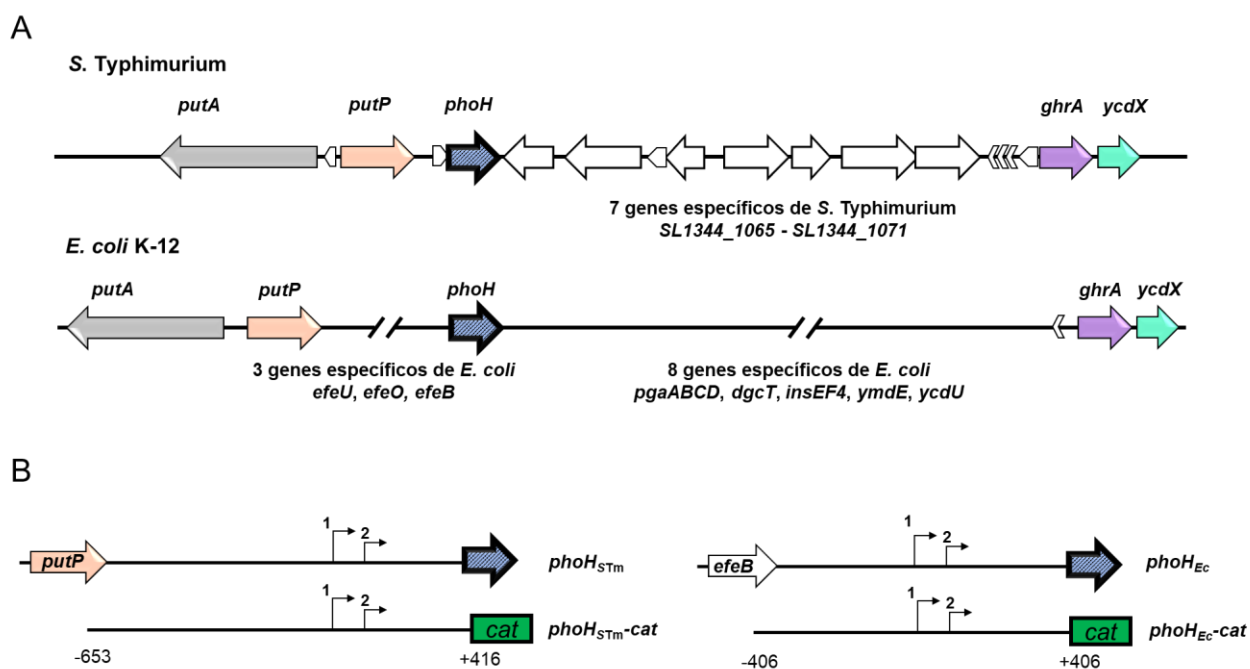


Fig. 4. Contexto genómico de los genes *phoH_{STm}* y *phoH_{Ec}* y representación esquemática de las fusiones *phoH_{STm}-cat* y *phoH_{Ec}-cat*. (A) Contexto genómico del gen *phoH* de las cepas *S. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* K-12 MG1655. (B) Representación esquemática de las fusiones transcripcionales *phoH_{STm}-cat* y *phoH_{Ec}-cat* que contienen completa la región intergénica corriente arriba de *phoH* de las cepas *S. Typhimurium* SL1344 o *E. coli* K-12 MG1655, respectivamente. Los sitios de inicio de la transcripción se muestran mediante flechas dobladas. Las posiciones indicadas son relativas al sitio de inicio transcripcional del promotor 1.

cepa WT *E. coli*+vector con respecto a la cepa WT *S. Typhimurium*+vector; además, fue inducida por el plásmido pK6-HilD tanto en el mutante $\Delta hilD$ como en la cepa WT *E. coli*, 4 y 8 veces, respectivamente (Fig. 5A). Por el contrario, la fusión *phoH_{Ec}-cat* mostró un bajo nivel de expresión en todas las cepas probadas (Fig. 5B), lo que indica que la expresión del gen *phoH_{Ec}* no es activada por HilD en las condiciones de crecimiento probadas. Para confirmar estos resultados, realizamos un análisis de Western blot para monitorear la expresión cromosómica de la proteína PhoH-FLAG (PhoH etiquetada con un epítipo 3XFLAG) en el mutante *S. Typhimurium* $\Delta hilD$ y la cepa WT *E. coli* que

lleva el plásmido pBAD-HilD1, que expresa a HilD a partir de un promotor inducible por arabinosa. De acuerdo con nuestros resultados obtenidos con las fusiones transcripcionales, en las condiciones evaluadas se detectó la proteína PhoH-FLAG de *S. Typhimurium* (PhoH_{STm}-FLAG), pero no PhoH-FLAG de *E. coli* (PhoH_{Ec}-FLAG); además, la expresión de HilD del plásmido pBAD-HilD1 aumentó la cantidad de PhoH_{STm}-FLAG en la mutante $\Delta hilD$ de forma dependiente de la dosis (Fig. 5C). Estos resultados muestran que el gen *phoH*_{STm}, pero no el gen *phoH*_{Ec}, es expresado y regulado por HilD en condiciones inductoras de SPI-1, lo que respalda que tanto la ganancia de HilD como la diferenciación de la secuencia reguladora llevaron al gen *phoH*_{STm} a expresarse en condiciones relevantes para la virulencia de *Salmonella*.

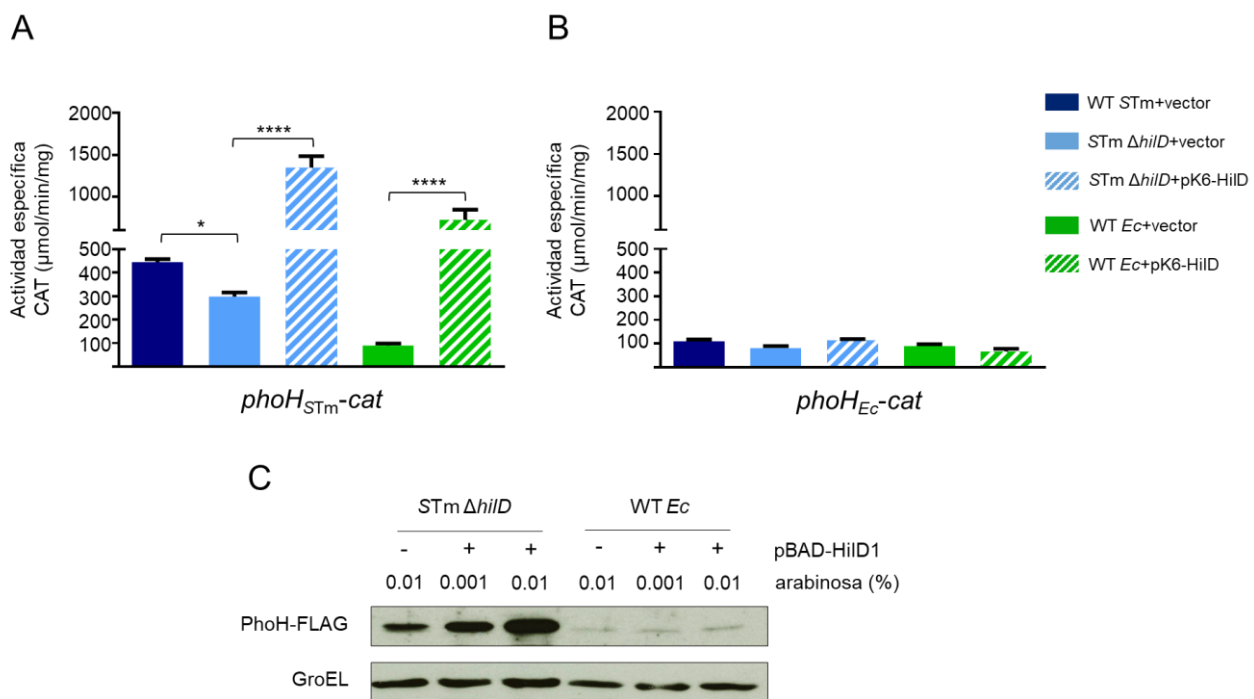


Fig. 5. El gen *phoH*_{STm}, pero no *phoH*_{Ec}, se expresa y regula por HilD en condiciones inductoras de SPI-1. La actividad específica CAT de las fusiones transcripcionales *phoH*_{STm}-cat (A) y *phoH*_{Ec}-cat (B), contenidas en los plásmidos ppho_{STm}-cat y ppho_{Ec}-cat, respectivamente, se determinó en la cepa WT *S. Typhimurium* (STm) SL1344, su mutante $\Delta hilD$ derivado, y la cepa MC4100 de *E. coli* (Ec) WT, en presencia del vector pMPM-K6 o el plásmido pK6-HilD que expresa HilD a partir de un promotor inducible por arabinosa. La expresión de HilD a partir del plásmido pK6-HilD se indujo con L-arabinosa al 0,001 % añadida al medio al comienzo de los cultivos. Los datos representan el promedio con la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se indican valores estadísticamente diferentes (*, $P = 0,0148$; ****, $P < 0,0001$).

$P < 0,0001$). (C) La expresión de la proteína PhoH-FLAG en la mutante *STm* $\Delta hilD$ y la cepa WT *E. coli* (*Ec*) MG1655 que lleva el vector pBADMycHisC (-) o el plásmido pBAD-HilD1, que expresa HilD a partir de un promotor inducible por arabinosa, se analizó mediante Western blot utilizando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control, también se detectó la expresión de GroEL utilizando anticuerpos policlonales anti-GroEL. La expresión de HilD del plásmido pBAD-HilD1 se indujo con las cantidades indicadas de L-arabinosa añadidas al medio 2 h después de la inoculación de los cultivos. La actividad CAT y la detección de las proteínas PhoH-FLAG y GroEL se determinaron a partir de muestras de cultivos bacterianos cultivados en LB a 37 °C durante 9 y 4 h, respectivamente.

9.1.2. HilD induce específicamente la expresión del promotor P1 de *phoH_{STm}*

Estudios previos de transcriptómica revelaron dos sitios de inicio de transcripción (IT) para el gen *phoH_{STm}* (Kröger et al., 2013; Ramachandran et al., 2014). Para determinar si estos IT son realmente generados por dos promotores diferentes (P1 y P2) y si HilD regula a ambos o solo a uno de ellos, construimos y analizamos la expresión de fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* que solo contienen el promotor putativo P1 (P1*phoH_{STm}-cat*) o P2 (P2*phoH_{STm}-cat*) (Fig. 6A). La expresión de estas fusiones se cuantificó en la cepa WT *S. Typhimurium* y su mutante derivada $\Delta hilD$ que lleva el vector pMPM-K6 o el plásmido pK6-HilD que expresa a HilD, en condiciones inductoras de SPI-1. Las dos fusiones mostraron expresión en la cepa WT *STm*+vector, indicando que tanto el promotor P1 como el P2 están activos en las condiciones ensayadas, siendo el promotor P1 2 veces más activo que el promotor P2 (Fig. 6B). Sin embargo, solo la expresión de la fusión P1*phoH_{STm}-cat* disminuyó en la mutante $\Delta hilD$ +vector y fue inducida por la presencia del plásmido pK6-HilD (Fig. 6B). De acuerdo con estos resultados, en los ensayos de retardo en gel (EMSA), la proteína purificada MBP-HilD se unió al fragmento *phoH_{STm}* contenido en la fusión P1*phoH_{STm}-cat*, pero no al contenido en la fusión P2*phoH_{STm}-cat* (Fig. 6C). Juntos, estos resultados indican que HilD regula solo el promotor P1 del gen *phoH_{STm}*.

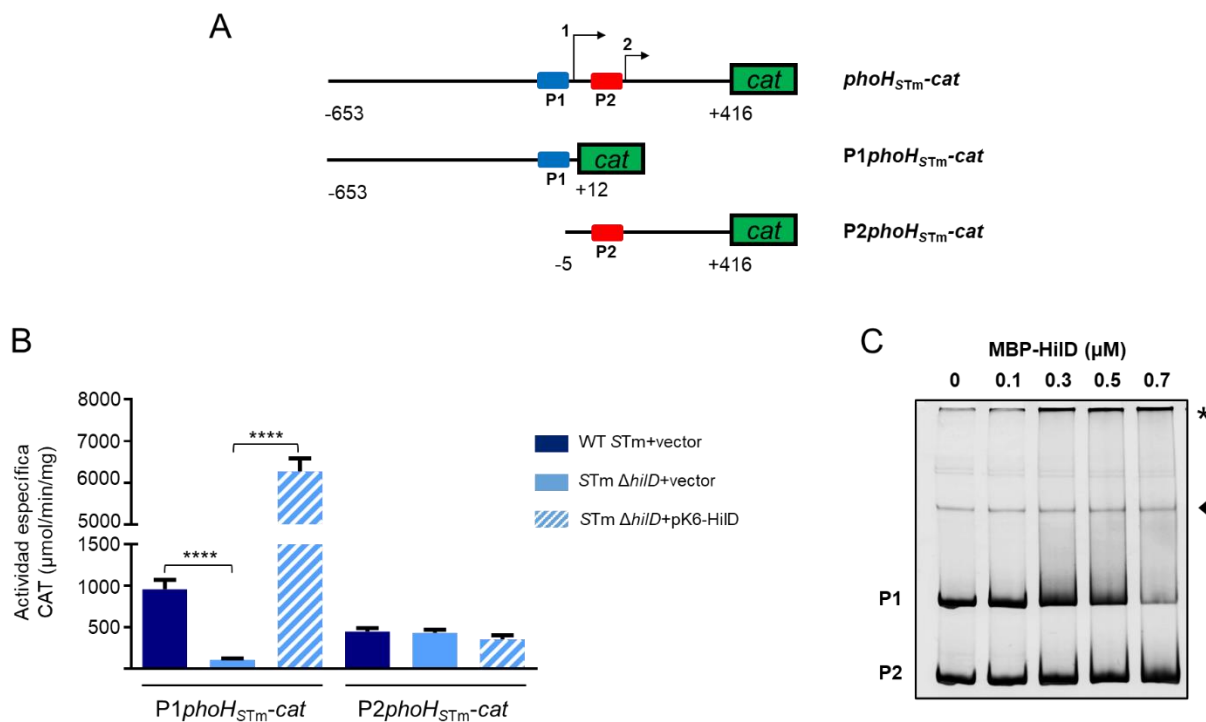


Fig. 6. HilD regula directamente el promotor P1 de *phoH_{STm}*. (A) Representación esquemática de las fusiones transcripcionales *P1phoH_{STm}-cat* y *P2phoH_{STm}-cat* que contienen el promotor 1 o 2 de *phoH_{STm}*, respectivamente. Se muestran los sitios de inicio de la transcripción (flechas dobladas) y los promotores (azul y rojo). Las posiciones indicadas son relativas al sitio de inicio transcripcional del promotor 1. (B) La actividad específica CAT de las fusiones transcripcionales *P1phoH_{STm}-cat* y *P2phoH_{STm}-cat*, contenidas en los plásmidos *P1phoH_{STm}-cat* y *P2phoH_{STm}-cat*, respectivamente, se determinó en la cepa WT *S. Typhimurium* (STm) SL1344 y su mutante derivada Δ *hilD* que porta el vector pMPM-K6 o el plásmido pK6-HilD que expresa a HilD a partir de un promotor inducible por arabinosa. La expresión de HilD a partir del plásmido pK6-HilD se indujo con L-arabinosa al 0,001 % añadida al medio al comienzo de los cultivos. La actividad CAT se cuantificó a partir de muestras de cultivos bacterianos cultivados en LB a 37 °C durante 9 h. Los datos representan el promedio con la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se indican valores estadísticamente diferentes (****, $P < 0,0001$). (C) La unión de MBP-HilD a los fragmentos de *phoH_{STm}* contenidos en las fusiones *P1phoH_{STm}-cat* (P1) y *P2phoH_{STm}-cat* (P2) se analizó mediante EMSA competitivos no radiactivos. Los complejos DNA-proteína se indican con un asterisco. Los productos de PCR no específicos se indican con una flecha.

9.1.3. Cambios en la región reguladora del promotor P1 condujeron a la regulación de

phoH_{STm} por HilD

Para delimitar la secuencia requerida para el control del promotor P1 de *phoH_{STm}* por parte de HilD, construimos y analizamos la expresión de dos fusiones a *cat* adicionales, con diferentes deleciones en los extremos 5' y 3' con respecto a la fusión *P1phoH_{STm}-cat*-653+12 utilizada

inicialmente (Tabla 2). La expresión de estas dos nuevas fusiones, P1*phoH*_{STm}-*cat*-248+12 y P1*phoH*_{STm}-*cat*-67+3, disminuyó de manera similar en la mutante Δ *hilD*+vector con respecto a la cepa WT *STm*+vector y fue inducida en la mutante Δ *hilD* por la presencia del plásmido pK6-HilD (Fig. 7A). Estos resultados revelan que HilD actúa sobre la secuencia entre las posiciones -67 y +3 del promotor P1 de *phoH*_{STm} (P1*phoH*_{STm}), secuencia contenida en la fusión P1*phoH*_{STm}-*cat*-67+3. De acuerdo con esta conclusión, se predijo un sitio de unión a HilD entre las posiciones -59 y -25 de P1*phoH*_{STm}, que muestra un contenido de A+T del 62% (Fig. 7B). Estudios previos indican que los sitios de unión de HilD tienen un alto contenido de A+T (Olekhovich and Kadner, 2007; Singer et al., 2014).

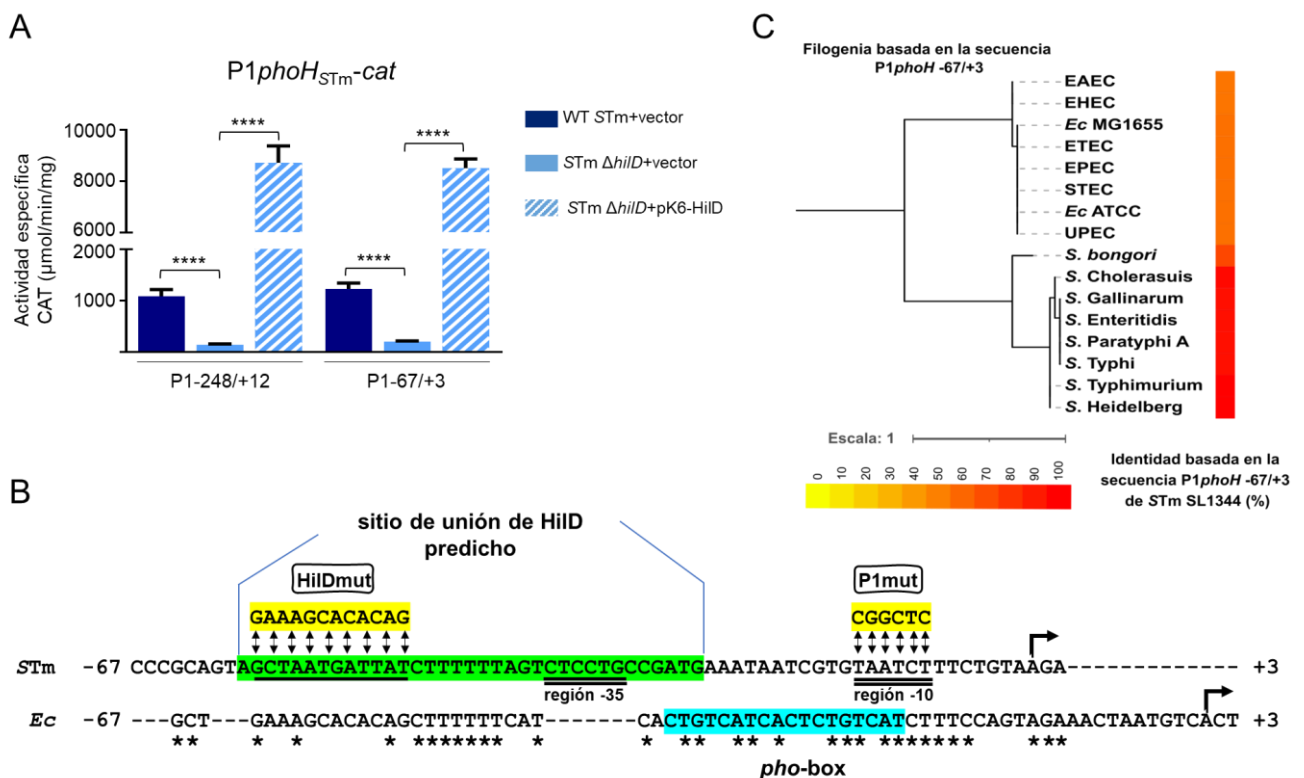


Fig. 7. HilD induce la expresión de *phoH*_{STm} actuando sobre una secuencia reguladora diferenciada entre *Salmonella* y *E. coli*. (A) La actividad específica CAT de las fusiones transcripcionales P1*phoH*_{STm}-*cat*-248+12 y P1*phoH*_{STm}-*cat*-67+3, contenidas en los plásmidos pP1*phoH*_{STm}-248+12-*cat* y pP1*phoH*_{STm}-67+3-*cat*, respectivamente, fue determinada en la cepa WT *S. Typhimurium* (*STm*) SL1344 y su mutante derivada Δ *hilD* transformada con el vector pMPM-K6 o el plásmido pK6-HilD que expresa a HilD a partir de un promotor inducible por arabinosa. La expresión de HilD a partir del plásmido pK6-HilD se indujo con L-arabinosa al

0,001 % añadida al medio al comienzo de los cultivos. La actividad CAT se cuantificó a partir de muestras de cultivos bacterianos cultivados en LB a 37 °C durante 9 h. Los datos representan el promedio con la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se indican valores estadísticamente diferentes (****, $P < 0,0001$). (B) Alineamiento de las secuencias P1*phoH*-67/+3 de *S. Typhimurium* (STm) SL1344 y *E. coli* (*Ec*) MG1655. Se muestran el sitio de unión a HilD predicho en la secuencia STm y el sitio de unión a PhoB (*pho*-box) en la secuencia *Ec*. Se muestran las mutaciones generadas en el sitio de unión a HilD predicho y en la región -10 del promotor P1*phoH*_{STm} (HilDmut y P1mut respectivamente). Las flechas dobladas indican el sitio de inicio de la transcripción del respectivo promotor P1. Los asteriscos indican nucleótidos conservados. (C) Árbol filogenético basado en la secuencia P1*phoH*-67/+3 de *E. coli* O104:H4 (EAEC), *E. coli* O157:H7 (EHEC), *E. coli* K-12 MG1655, *E. coli* O78:H11 (ETEC), *E. coli* O127:H6 (EPEC), *E. coli* STEC_7v (STEC), *E. coli* K-12 ATCC 1175, *E. coli* 26-1 (UPEC), *S. bongori*, *S. Choleraesuis* SC- B67, *S. Gallinarum* 9184, *S. Enteritidis* 22510-1, *S. Paratyphi* A ATCC 11511, *S. Typhi* Ty2, *S. Typhimurium* SL1344 y *S. Heidelberg* 41563. Se muestra la identidad con respecto a la secuencia de *S. Typhimurium* SL1344 con un mapa de calor.

Para confirmar que HilD activa la expresión de *phoH*_{STm} actuando sobre el promotor P1 de este gen, se mutaron el sitio de unión de HilD predicho o la región -10 del promotor P1, como se indica en la figura 7B, en *phoH*_{STm}-*cat*-653+416 que lleva la región reguladora completa de *phoH*_{STm} (contiene los promotores P1 y P2), generando así las fusiones *phoH*_{HilDmut}-*cat* y *phoH*_{P1mut}-*cat*, respectivamente. La expresión de la fusión transcripcional silvestre y sus mutadas derivadas se cuantificó en la cepa WT *S. Typhimurium* y la mutante Δ *hilD* que lleva el vector pMPM-K6 o el plásmido pK6-HilD que expresa HilD, en condiciones inductoras de SPI-1. Como se observó previamente (Fig. 5A), la fusión silvestre *phoH*_{STm}-*cat* mostró regulación por HilD, es decir, su expresión disminuyó y aumentó en las cepas Δ *hilD*+vector y Δ *hilD*+pK6-HilD, respectivamente (Fig. 8A). Por el contrario, tanto las fusiones *phoH*_{HilDmut}-*cat* como *phoH*_{P1mut}-*cat* mostraron un nivel de expresión bajo que fue similar en las tres cepas probadas (Fig. 8A), lo que indica que la regulación de la expresión de *phoH*_{STm} por HilD se abate cuando el sitio de unión de HilD predicho o el promotor P1 están mutados. Luego, se realizaron EMSA que confirmaron que HilD se une al sitio predicho corriente arriba del promotor P1 (Fig. 8B-D). La proteína MBP-HilD utilizada en los EMSA aparentemente forma complejos demasiado grandes que quedan cerca de los pocillos del gel, con o sin los fragmentos de DNA analizados. No obstante, el fragmento WT P1*phoH*-157/+12 y el que lleva el promotor P1 mutado, pero no el que lleva la

secuencia de unión a HilD mutada, se unieron a MBP-HilD (Fig. 8B-D). En conjunto, estos resultados muestran que HilD regula positiva y específicamente el promotor P1 de *phoH*_{STm} al unirse a un sitio que se superpone a la región -35 de este promotor.

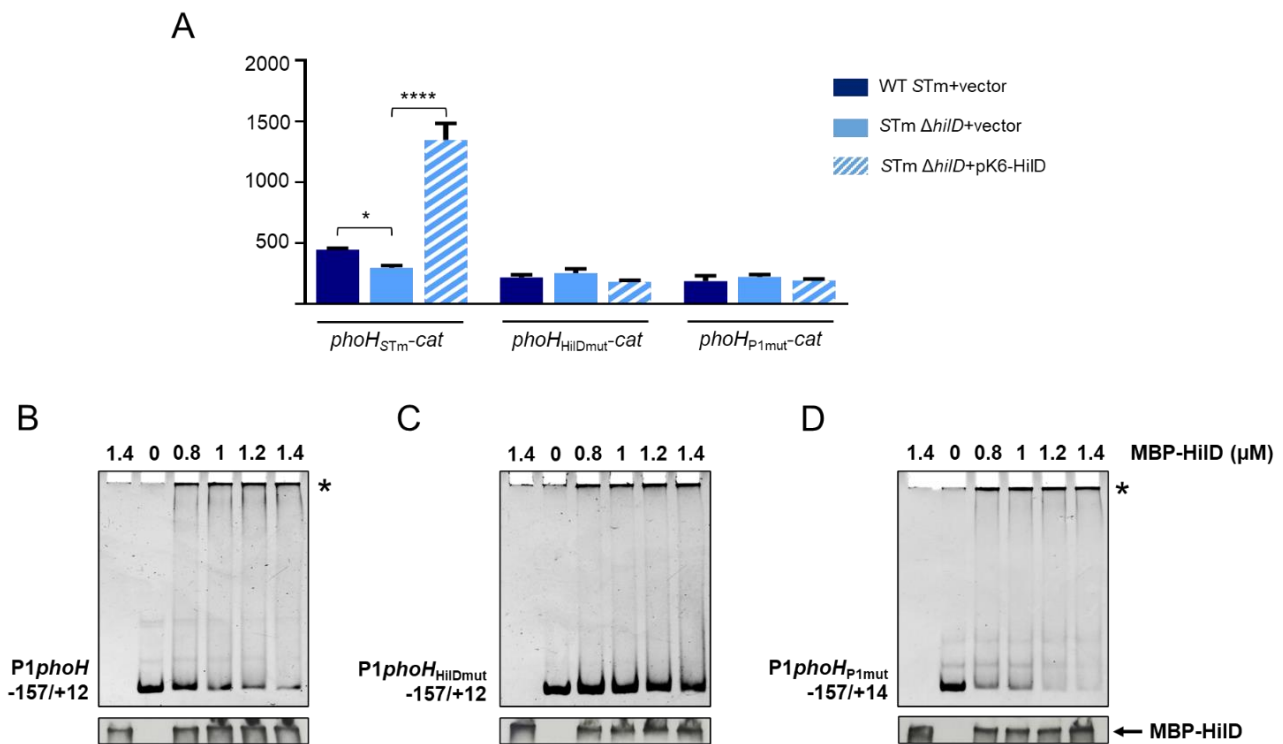


Fig. 8. HilD regula positivamente *phoH*_{STm} al unirse a un sitio que se superpone al promotor P1 de este gen. (A) La actividad específica CAT de las fusiones transcripcionales *phoH*_{STm}-cat, *phoH*_{HilDmut}-cat y *phoH*_{P1mut}-cat, contenidas en los plásmidos p*phoH*_{STm}-cat, p*phoH*_{HilDmut}-cat y p*phoH*_{P1mut}-cat, respectivamente, se determinó en la cepa WT *S. Typhimurium* (STm) SL1344 y su mutante derivada Δ *hilD* transformadas con el vector pMPPM-K6 o el plásmido pK6-HilD que expresa a HilD a partir de un promotor inducible por arabinosa. La expresión de HilD a partir del plásmido pK6-HilD se indujo con L-arabinosa al 0,001 % añadida al medio al comienzo de los cultivos. La actividad CAT se cuantificó a partir de muestras de cultivos bacterianos cultivados en LB a 37 °C durante 9 h. Los datos representan el promedio con la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se indican valores estadísticamente significativos (*, $P = 0,0148$; ****, $P < 0,0001$). La unión de MBP-HilD al fragmento WT P1*phoH*-157/+12 (B), el fragmento P1*phoH*_{HilDmut}-157/+12 mutado en el sitio de unión de HilD predicho (C) y el fragmento P1*phoH*_{P1mut}-157/+14 mutado en el promotor P1 (D) se analizó mediante EMSA no radiactivos. Los paneles superiores muestran el DNA libre y los complejos DNA-proteína teñidos con bromuro de etidio, y los paneles inferiores muestran la inmunodetección de MBP-HilD en la parte superior de los geles utilizando anticuerpos monoclonales anti-MBP. Los complejos DNA-proteína se indican con un asterisco.

Para el gen *phoH_{Ec}* también se han reportado dos promotores (Kim et al., 1993), que se encuentran en posiciones similares a las del gen *phoH_{STm}* (Fig. 4B). Como se muestra en la figura 5, el gen *phoH_{Ec}* no está regulado por HilD, lo que podría indicar que carece del sitio de acción de HilD ubicado corriente arriba de P1*phoH_{STm}*. Para investigar esta idea, realizamos un alineamiento de la secuencia -67/+3 de los correspondientes promotores P1 de *phoH_{STm}* y *phoH_{Ec}* (secuencias P1 -67/+3). Curiosamente, estas secuencias comparten solo un 45 % de identidad; además, los nucleótidos del supuesto sitio de unión de HilD ubicado en la secuencia de *S. Typhimurium* están pobremente conservados en la secuencia de *E. coli* (Fig. 7B). De manera consistente, no se predijo un sitio de unión a HilD en la secuencia P1 -67/+3 de *E. coli*. Para explorar si las diferencias mostradas por la secuencia P1 -67/+3 de *phoH_{STm}* y *phoH_{Ec}* son producto de una divergencia evolutiva entre *Salmonella* y *E. coli*, o son específicas de las cepas bacterianas analizadas, ampliamos el análisis de la secuencia P1 -67/+3 de *phoH* a otras serovariantes de *S. enterica*, a la especie *S. bongori* y a otras cepas K12 y patotipos de *E. coli*. Como se muestra en la figura 7C, un análisis filogenético basado en la secuencia P1 -67/+3 de *phoH* agrupó las cepas analizadas de *Salmonella* y *E. coli* en dos clados diferentes. De acuerdo con estos resultados, la secuencia P1 -67/+3 de *S. Typhimurium* está mejor conservada en las serovariantes de *S. enterica* (94-100% de identidad), y en menor medida en *S. bongori* (73% de identidad), que en las cepas de *E. coli* evaluadas (54-56% de identidad) (Fig. 7C). Estos resultados sugieren que durante la divergencia evolutiva entre *Salmonella* y *E. coli* ocurrió una diferenciación de la secuencia P1 -67/+3 de *phoH*.

En conjunto, nuestros resultados indican que durante la evolución de *Salmonella* se generaron cambios en la región reguladora de *phoH_{STm}*, que propiciaron la regulación de este gen por el regulador adquirido HilD, en condiciones inductoras de SPI-1.

9.1.4. Los genes *phoH_{STm}* y *phoH_{Ec}* son diferencialmente regulados por el represor H-NS

HilD induce la expresión de sus genes blanco al contrarrestar la represión mediada por H-NS y en ausencia de la actividad de H-NS, estos genes se expresan independientemente de HilD (Banda et al., 2019b, 2019a; Bustamante et al., 2008; Fàbrega and Vila, 2013; Martínez et al., 2014; Olekhovich and Kadner, 2007; Romero-González et al., 2020). Entonces, intentamos determinar si HilD utiliza un mecanismo similar para inducir la expresión del gen *phoH_{STm}*. Las mutantes *hns* de *Salmonella* muestran graves defectos de crecimiento debido a la sobreexpresión de SPI-1 y otros genes relacionados, y se generan mutaciones supresoras (Ali et al., 2014; Navarre et al., 2006). Así, para analizar el efecto de H-NS sobre el gen *phoH_{STm}* se utilizó la cepa WT *E. coli* MC4100 y su derivada mutante Δhns , que no presenta defectos de crecimiento. Los fondos genéticos de *E. coli* han sido útiles para estudiar la regulación de otros genes de *Salmonella* por H-NS (H-NS de *S. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* MC4100 comparten un 95 % de identidad) (Banda et al., 2019a; Romero-González et al., 2020). Por otro lado, HilD induce la expresión de *phoH_{STm}* en *E. coli* K-12 (Fig. 5A), lo que indica que no se requiere ningún otro regulador específico de *Salmonella* para la expresión de este gen mediada por HilD. Cuantificamos la expresión de la fusión *phoH_{STm}-cat* en la cepa WT *E. coli* MC4100 y su mutante derivada Δhns que lleva el vector pMPM-K6 o el plásmido pK6-HilD que expresa a HilD, cultivado en condiciones inductoras de SPI-1. Como control, la expresión de esta fusión también se probó en la cepa WT *S. Typhimurium* que porta el vector pMPM-K6. De acuerdo con los resultados descritos anteriormente (Fig. 5A), la expresión de la fusión *phoH_{STm}-cat* se indujo en la cepa WT *STm*+vector así como en la cepa WT *E. coli*+pK6-HilD, pero no en la cepa WT *E. coli*+vector (Fig. 9A). Particularmente, en la cepa *E. coli* Δhns +vector, la expresión de la fusión *phoH_{STm}-cat* alcanzó niveles similares a los de la cepa WT *S. Typhimurium* (Fig. 9A). Estos resultados muestran que H-NS reprime la expresión de *phoH_{STm}* y que, en ausencia de H-NS, este gen se expresa independientemente de HilD, lo que respalda que HilD induce la expresión de *phoH_{STm}* al contrarrestar la represión mediada por H-NS. Sin embargo, la presencia del plásmido pK6-HilD aumentó aún más (dos veces) la

expresión de la fusión *phoH_{STm}-cat* en la mutante Δhns de *E. coli* (Fig. 9A), lo que indica que HilD también induce la expresión parcial del gen *phoH_{STm}* por un mecanismo independiente de H-NS.

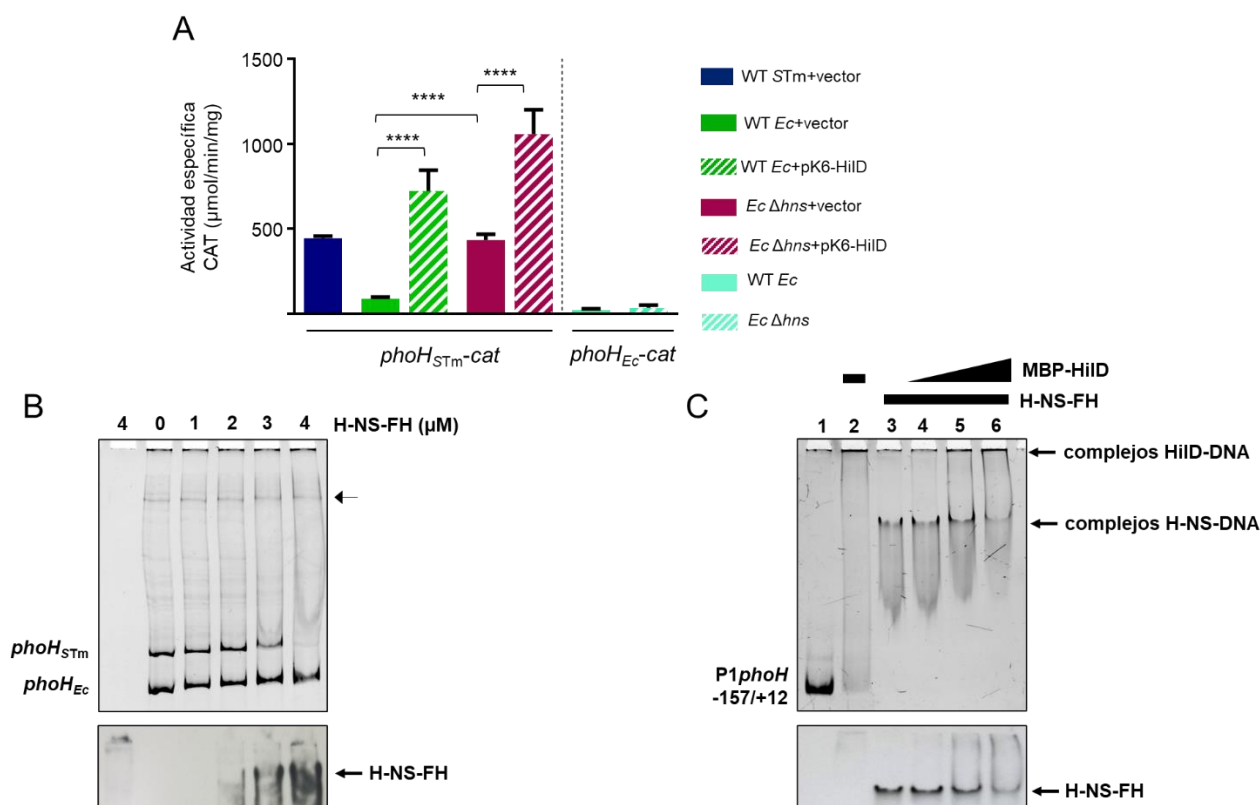


Fig. 9. HilD antagoniza la represión mediada por H-NS en *phoH_{STm}*. (A) La actividad específica CAT de la fusión transcripcional *phoH_{STm}-cat*, contenida en el plásmido pphoH_{STm}-cat, se evaluó en la cepa WT *S. Typhimurium* (*STm*) SL1344, así como en la cepa WT *E. coli* (*Ec*) MC4100 y su mutante derivada Δhns en presencia del vector pMPM-K6 o el plásmido pK6-HilD que expresa a HilD a partir de un promotor inducible por arabinosa. La actividad específica CAT de la fusión transcripcional *phoH_{Ec}-cat*, contenida en el plásmido pphoH_{Ec}-cat, se evaluó en la cepa WT *E. coli* (*Ec*) MC4100 y su mutante derivada Δhns . La expresión de HilD a partir del plásmido pK6-HilD se indujo con L-arabinosa al 0,001 % añadida al medio al comienzo de los cultivos. La actividad CAT se cuantificó a partir de muestras de cultivos bacterianos cultivados en LB a 37 °C durante 9 h. Los datos representan el promedio con desviaciones estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se indican valores estadísticamente significativos (****, $P < 0,0001$). (B) La unión de H-NS-FH a los fragmentos *phoH* contenidos en las fusiones *phoH_{STm}-cat* y *phoH_{Ec}-cat*, que llevan la región reguladora completa de *phoH_{STm}* y *phoH_{Ec}*, respectivamente, se analizó mediante EMSA competitivos no radiactivos. Los complejos DNA-proteína se indican con un asterisco. Los productos de PCR no específicos se indican con una flecha. (C) EMSA no radiactivos competitivos entre HilD-MBP y H-NS-FH en el fragmento P1*phoH*-157/+12 de *phoH_{STm}*. Se añadió la proteína H-NS-FH purificada a 4 mM (carriles 3 a 6), y se añadió proteína MBP-HilD purificada a 0.4, 0.8 y 1.2 mM (carriles 4 a 6, respectivamente). No se añadió proteína en el carril 1 y se añadió MBP-HilD a 1.2 mM en el carril 2. En los EMSA, los paneles superiores muestran el DNA libre y los complejos ADN-proteína teñidos con bromuro de etidio, mientras que los paneles inferiores

muestran la inmunodetección de H-NS-FH en los complejos DNA-proteína en la parte superior (B) o dentro de los carriles de los geles (C), utilizando anticuerpos monoclonales anti-FLAG.

A continuación, evaluamos si H-NS también reprime la expresión del gen *phoH_{Ec}*. Para ello, se cuantificó la expresión de la fusión *phoH_{Ec}-cat* en las cepas WT *E. coli* y Δhns cultivadas en condiciones inductoras de SPI-1. La fusión *phoH_{Ec}-cat* mostró niveles de expresión muy bajos en ambas cepas de *E. coli* (Fig. 9A), demostrando que, a diferencia de lo observado para *phoH_{STm}*, la expresión de *phoH_{Ec}* no es reprimida por H-NS en las condiciones probadas.

Además, se realizaron EMSA para determinar si H-NS regula directamente a *phoH_{STm}*. Como era de esperar, la proteína H-NS-FH (H-NS-Flag-His6) purificada se unió al fragmento de DNA que abarcaba toda la región reguladora de *phoH_{STm}*, pero no la de *phoH_{Ec}*, en las concentraciones analizadas (Fig. 9B). Los complejos DNA-H-NS-FH formados con toda la región reguladora de *phoH_{STm}* parecen ser muy grandes ya que se retuvieron cerca de los pozos del gel (Fig. 9B); con un fragmento más corto de la región reguladora de *phoH_{STm}* se detectaron los complejos DNA-H-NS-FH dentro del gel (Fig. 9C). Se conoce que H-NS se une a secuencias ricas en A+T (Fang and Rimsky, 2008); curiosamente, tanto la región reguladora de *phoH_{STm}* como la de *phoH_{Ec}* muestran un alto contenido de A+T, 57% y 55%, respectivamente. A continuación, analizamos mediante EMSA competitivos si MBP-HilD puede desplazar H-NS-FH de *phoH_{STm}*. Las reacciones de unión que contenían el fragmento P1*phoH*-157/+12 de *phoH_{STm}* se incubaron primero con una concentración constante de H-NS-FH y luego se añadieron concentraciones crecientes de MBP-HilD. También se probaron las reacciones de unión que contenían solo H-NS-FH o MBP-HilD. El complejo DNA-H-NS-FH fue desplazado por MBP-HilD a un complejo de migración más lenta que permaneció cerca de los pozos del gel, de manera similar al complejo formado solo por MBP-HilD; además, MBP-HilD disminuyó la cantidad de H-NS-FH unida al fragmento P1*phoH*-157/+12 (Fig. 9C). Estos resultados indican que HilD desplaza H-NS de *phoH_{STm}*.

En conjunto, estos resultados apoyan que la evolución del circuito regulatorio de *phoH_{STm}* condujo a la represión de este gen por parte de H-NS, que a su vez está implicada en la regulación de *phoH_{STm}* mediada por HilD.

9.1.5. Los genes *phoH_{STm}* y *phoH_{Ec}* se regulan diferencialmente en respuesta a fósforo inorgánico

El gen *phoH_{Ec}* pertenece al regulón del fosfato; su expresión es inducida por el sistema de dos componentes PhoR/B en respuesta a bajas concentraciones intracelulares de fósforo inorgánico (Pi) (Kazakov et al., 2003; Kim et al., 1993). Por lo tanto, fue de interés probar si el gen *phoH_{STm}* que fue reclutado en el regulón HilD conserva la regulación ancestral por el sistema PhoR/B en respuesta a bajo Pi. Para investigar esta noción, cuantificamos la expresión de la fusión *phoH_{STm}-cat* en la cepa WT *S. Typhimurium* y su mutante isogénica Δ *phoB* cultivadas en medio mínimo-N (MM-N) con una concentración alta o baja de Pi. Sorprendentemente, la expresión de la fusión *phoH_{STm}-cat* fue inducida en bajo Pi tanto en la cepa WT como en la mutante Δ *phoB* (Fig. 10A). Se obtuvieron resultados similares al analizar la expresión de la proteína PhoH_{STm}-FLAG (Fig. 10B). Por el contrario, la expresión de la proteína PhoH_{Ec}-FLAG o la fusión *phoH_{Ec}-cat* fue inducida por bajo Pi en la cepa WT *E. coli*, pero no, o solo levemente, en su mutante derivada Δ *phoB* (Fig. 10C y D). De acuerdo con estos resultados, un análisis *in silico* identificó una secuencia *pho*-box (sitio de unión a PhoB) reportada previamente en la secuencia reguladora de *phoH_{Ec}*, pero no predijo una *pho*-box en la secuencia correspondiente de *phoH_{STm}* (Fig. 7B) (Kim et al., 1993). La secuencia de *S. Typhimurium* conserva solo 10 de los 18 nucleótidos que forman la *pho*-box de *E. coli* (Fig. 7B). Estos resultados indican que tanto *phoH_{Ec}* como *phoH_{STm}* están regulados de manera similar por Pi pero a través de diferentes mecanismos, el de *phoH_{Ec}* involucra a PhoB y el de *phoH_{STm}* no.

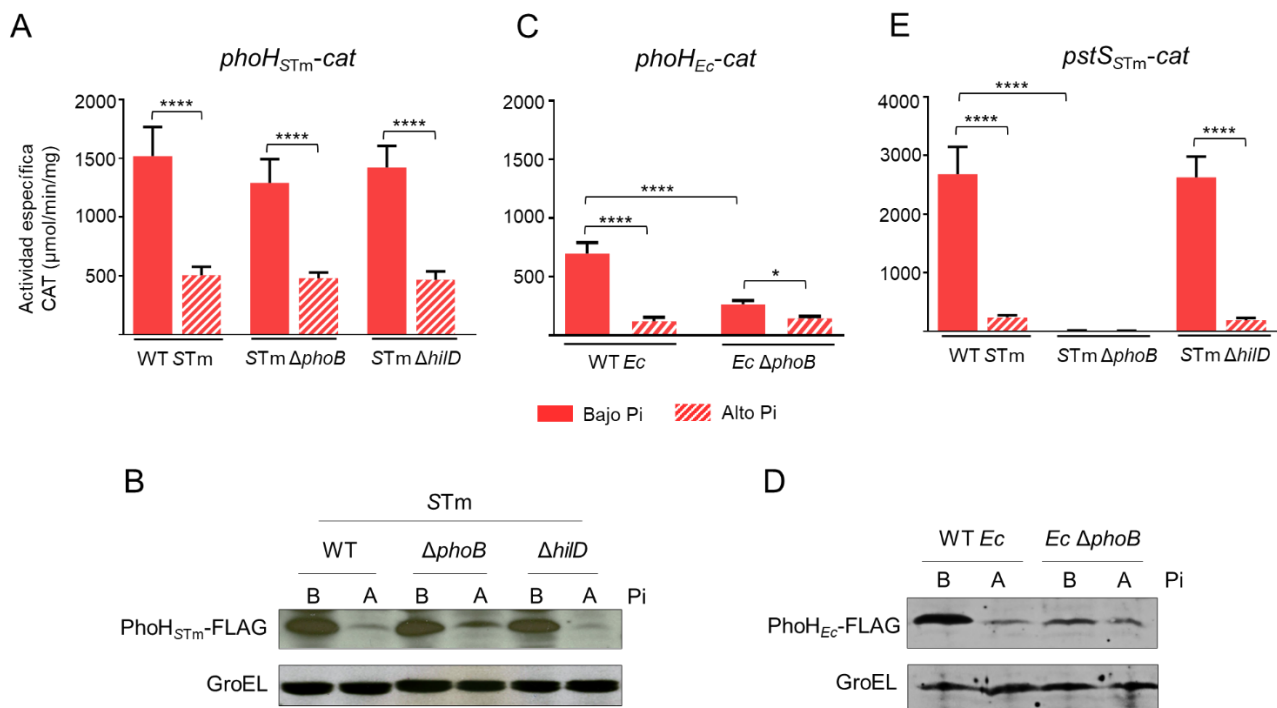


Fig. 10. La expresión de *phoH_{STm}* se activa en bajo Pi independientemente de PhoB o HilD. La actividad específica CAT de las fusiones transcripcionales *phoH_{STm}-cat* (A) y *pstS_{STm}-cat* (E), contenidas en los plásmidos pphoH_{STm}-cat y ppstS_{STm}-cat, respectivamente, se determinó en la cepa WT *S. Typhimurium* (STm) SL1344 y sus mutantes derivadas $\Delta phoB$ y $\Delta hilD$. Es conocido que *pstS* es regulado por PhoB; por lo tanto, se probó como un control positivo. (C) La actividad específica CAT de la fusión transcripcional *phoH_{Ec}-cat*, contenida en el plásmido pphoH_{Ec}-cat, se determinó en la cepa WT *E. coli* (*Ec*) BW25113 y su mutante derivada $\Delta phoB$. Los datos representan el promedio con la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se indican valores estadísticamente significativos (*, $P = 0,0108$; ****, $P < 0,0001$). La expresión de la proteína PhoH_{STm}-FLAG en la cepa WT *S. Typhimurium* (STm) SL1344 y sus mutantes derivadas $\Delta phoB$ y $\Delta hilD$ (B), así como la expresión de la proteína PhoH_{Ec}-FLAG en la cepa WT *E. coli* (*Ec*) MG1655 y su mutante derivada $\Delta phoB$ (D) se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control, también se detectó la expresión de GroEL utilizando anticuerpos policlonales anti-GroEL. La actividad CAT y la detección de las proteínas PhoH-FLAG y GroEL se determinaron a partir de muestras de cultivos bacterianos cultivados durante 16 h a 37 °C en MM-N que contenía bajo (B) o alto (A) Pi.

A continuación, nos preguntamos si en *S. Typhimurium* la regulación por Pi independiente de PhoB también actúa sobre el gen *pstS*, que se ha demostrado que pertenece al regulón del fosfato y que está regulado por PhoB en diferentes bacterias. Este gen codifica un componente de un transportador de Pi de alta eficiencia (Santos-Beneit, 2015). Entonces construimos y evaluamos una fusión

transcripcional a *cat* del gen *pstS* de *S. Typhimurium* SL1344 (*pstS_{STm}*) en las mismas cepas bacterianas y condiciones de crecimiento que en el experimento anterior. La expresión de la fusión *pstS_{STm}-cat* fue inducida por bajo Pi en la cepa WT *S. Typhimurium*, pero no en su mutante derivada Δ *phoB* (Fig. 10E), lo que indica que el gen *pstS_{STm}* está regulado por el Pi a través de PhoB. Consistentemente, un análisis computacional identificó en *pstS_{STm}* (datos no mostrados) la *pho*-box reportada previamente para el gen de *E. coli* (Yang et al., 2012).

Como era de esperar, según diferentes estudios que indican que HilD no afecta la expresión de sus genes blanco cuando *S. Typhimurium* se cultiva en medios mínimos (Bustamante et al., 2008; Kröger et al., 2013), la regulación por Pi de *phoH_{STm}* y *pstS_{STm}* fue similar en la cepa WT y su mutante derivada Δ *hilD* (Fig. 10A, B y E).

En conjunto, estos resultados respaldan que el gen *phoH_{STm}* evolucionó para ser regulado por Pi a través de un mecanismo independiente de PhoB.

9.1.6. El gen *phoH_{STm}* interviene en la colonización intestinal en ratones

La proteína PhoH tiene actividad ATPasa; sin embargo, su función permanece desconocida en todas las bacterias en las que se encuentra (Kazakov et al., 2003; Kim et al., 1993). Nuestros resultados y otros, muestran que el gen ancestral *phoH* pertenece al regulón de HilD (Colgan et al., 2016; Martínez-Flores et al., 2016), principal regulador de los genes necesarios para la invasión de *S. Typhimurium* al epitelio intestinal y el establecimiento de la colitis (Fàbrega and Vila, 2013). Para determinar si PhoH es necesaria para el establecimiento de la infección intestinal, se analizó la infección causada por la cepa WT de *S. Typhimurium* y su mutante derivada Δ *phoH*, en ratones pretratados con estreptomicina, el cual es utilizado como un modelo de colitis provocada por *S. Typhimurium* (Barthel et al., 2003). Como control, se incluyó a la mutante Δ *siiE*, que presenta un fenotipo de adherencia disminuido (Gerlach et al., 2007). Nuestros resultados preliminares mostraron

que se recuperaron menos UFCs de la mutante $\Delta phoH$ en la heces de los ratones en comparación con la cepa WT, a las 24 y 48 h pos-infección. Como se esperaba, de la mutante $\Delta siiE$ también se recuperó un número menor de UFCs respecto a la cepa WT a las 24 y 48 h (Fig. 11A). Estos resultados apoyan la idea de que PhoH está involucrado en la infección intestinal en ratones. Sin embargo, cantidades similares de las tres cepas probadas fueron recuperadas del bazo de los ratones, lo que sugiere que PhoH no se requiere para el establecimiento de la infección sistémica (Fig. 11B). No obstante, más estudios deben ser realizados para determinar el papel de PhoH en la colonización intestinal e infección sistémica en este y otros modelos de infección.

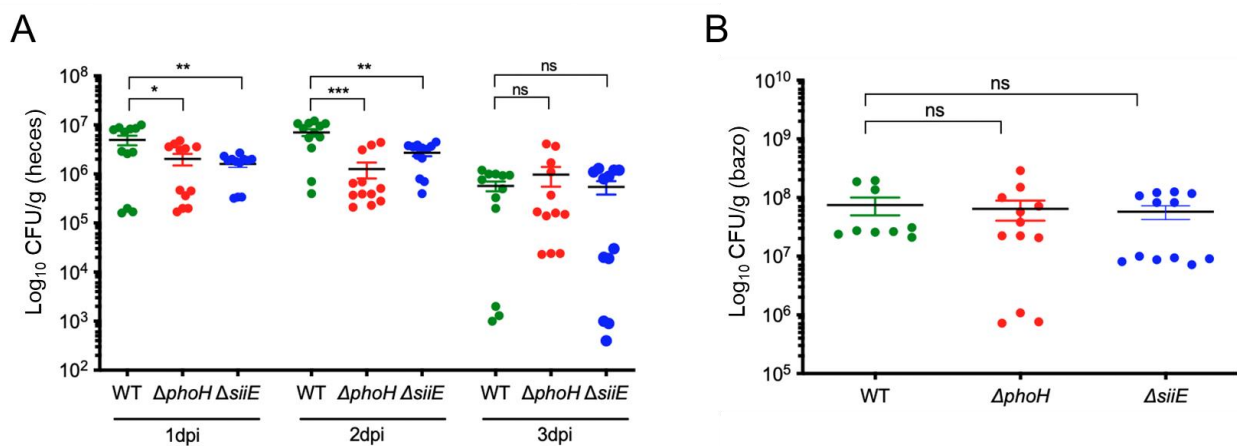


Fig. 11. Efecto de $phoH_{STM}$ en la colonización intestinal e infección sistémica de ratones por *S. Typhimurium*. Se inocularon grupos de 12 ratones pretratados con estreptomicina por vía oral con la cepa WT *S. Typhimurium* o sus mutantes derivadas $\Delta phoH$ o $\Delta siiE$. (A). Se determinaron los números de CFU/g de las heces a los 1, 2 y 3 días pos-infección (dpi). (B) Los números de CFU/g del bazo se determinaron 1 día pos-infección. Las barras denotan los errores estándar de los promedios para cada grupo experimental. Se indican valores estadísticamente significativos (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

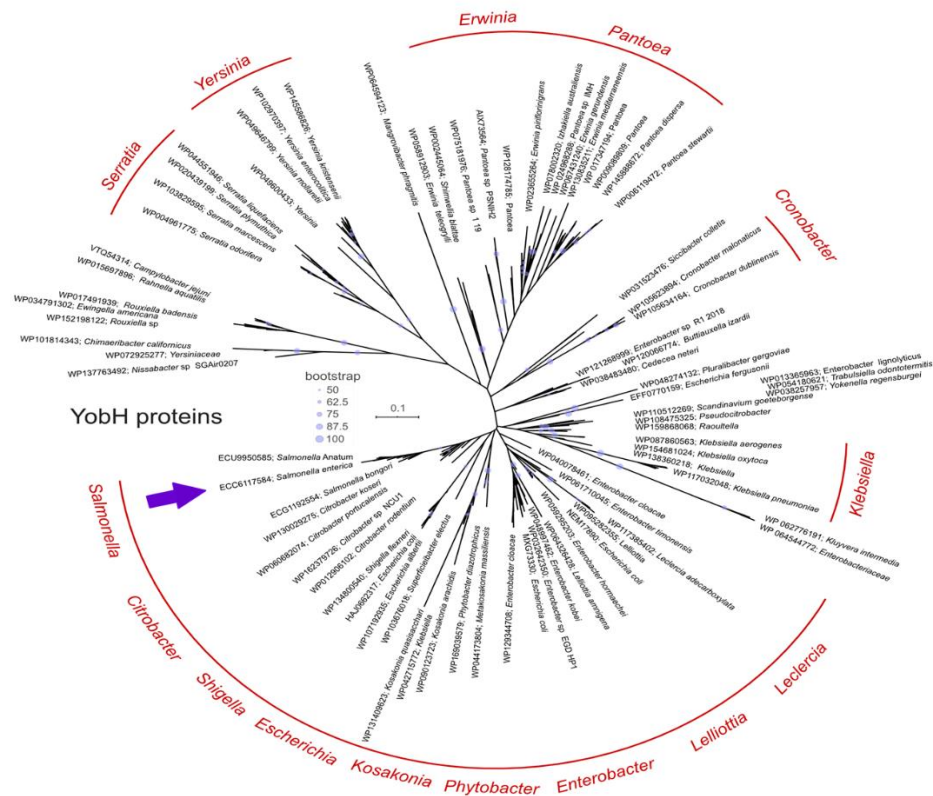
9.2. Adaptación de la regulación transcripcional de *yobH* mediada por HilD-SprB

9.2.1. La expresión de *yobH*_{STm} se favorece en condiciones inductoras de SPI-1

El gen ancestral *yobH* se encuentra en ambas especies del género *Salmonella* y codifica para un polipéptido (YobH) de 79 aminoácidos sin caracterizar funcionalmente, pero que participa en la invasión de *S. Typhimurium* a células epiteliales (Banda et al., 2019a). Producto de un análisis filogenético que realizamos con YobH encontramos que además de *Salmonella*, este polipéptido está conservado en la familia *Enterobacteriaceae* y en otras familias también pertenecientes al orden de las Enterobacterales, como *Erwiniaceae* y *Yersiniaceae* (Fig. 12A y B). Este amplio y heterogéneo grupo de bacterias habitan diferentes nichos ecológicos y se han encontrado en el suelo, el agua y en asociación con organismos vivos, incluidas plantas, animales y humanos (Adeolu et al., 2016). Dentro de este grupo encontramos varios patógenos como *S. enterica* y *Yersinia pestis* entre otros, pero también cepas no patógenas como *E. coli* K-12 (Adeolu et al., 2016; Brady et al., 2010; Parkhill et al., 2001).

Precisamente encontramos que el contexto genómico de *yobH* se encuentra altamente conservado en *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12 (Fig. 13A). De hecho, los genes estructurales *yobH* y sus proteínas YobH codificadas presentan altos porcentajes de identidad de nucleótidos y aminoácidos, con un 68% y 78%, respectivamente; mientras que las regiones intergénicas corriente arriba de ambos genes cuentan con un 65 % de identidad (Fig. 13A). Esto nos indica que la región del DNA donde se encuentra *yobH* se ha conservado en ambas bacterias. Sin embargo, estudios previos muestran que *yobH* es regulado transcripcionalmente por HilD a través de SprB, dos reguladores exclusivos de *Salmonella* (Banda et al., 2019a); regulación que parece haberse adaptado específicamente sobre *yobH*, ya que no hay indicios de que algún otro gen del contexto genómico de *yobH* que sea regulado por SprB (Fig. 13B). Por tales motivos, resulta interesante estudiar el reclutamiento de la regulación de

A



B

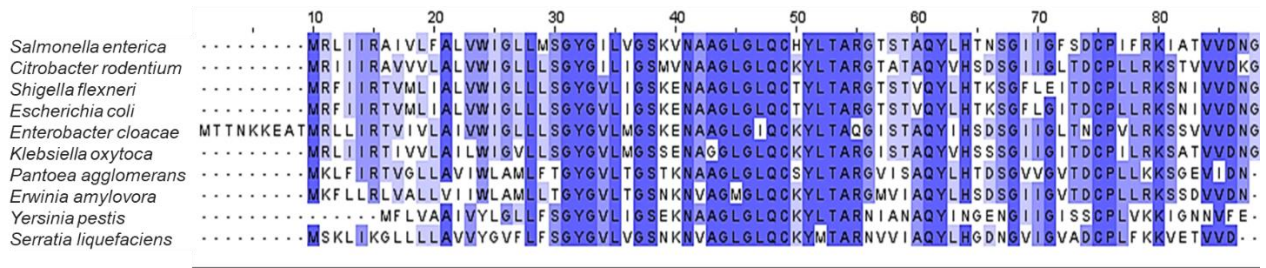


Fig. 12. YobH está conservada en las familias *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* y *Yersiniaceae*. (A) Árbol filogenético de YobH. Las secuencias de YobH se recuperaron mediante búsquedas en BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) de la base de datos de secuencias de proteínas GenBank nr y se descargaron del mismo sitio. Los valores de confianza de Bootstrap se calcularon a partir de 100 repeticiones. (B) Alineamiento de la proteína YobH de diferentes bacterias representativas de las familias *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* y *Yersiniaceae*, utilizando el programa Clustal Omega. La intensidad del color azul representa el grado de conservación de las secuencias de aminoácidos.

yobH por HilD-SprB para la virulencia de *S. Typhimurium*. Para ello, comenzamos por evaluar la expresión cromosómica de la proteína YobH-FLAG (YobH etiquetada con 3XFLAG) en las cepas silvestres de *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12, en medio LB mediante Western blot. Como se observa en la figura 14A, la expresión de la proteína YobH de *S. Typhimurium* (YobH_{STm}) fue notablemente

mayor que la expresión de la proteína YobH de *E. coli* K-12 ($YobH_{Ec}$) (Fig. 14A). Luego, construimos una fusión transcripcional a *cat* del gen *yobH* de *E. coli* ($yobH_{Ec-cat}$) y medimos su expresión en la cepa WT *E. coli* en las mismas condiciones, al igual que la expresión de la fusión $yobH_{STm-cat}$ en la cepa WT *S. Typhimurium*, misma que fue utilizada para analizar la regulación de *yobH* de *S. Typhimurium* ($yobH_{STm}$) por HiLD-SprB (Banda et al., 2019a). Coincidente con la expresión de las proteínas, la expresión de la fusión $yobH_{STm-cat}$ fue considerablemente mayor (6 veces) que $yobH_{Ec-cat}$ (Fig. 14B). Estos resultados indican que la expresión de $yobH_{STm}$ se favorece sobre la de $yobH_{Ec}$, en condiciones inductoras de SPI-1.

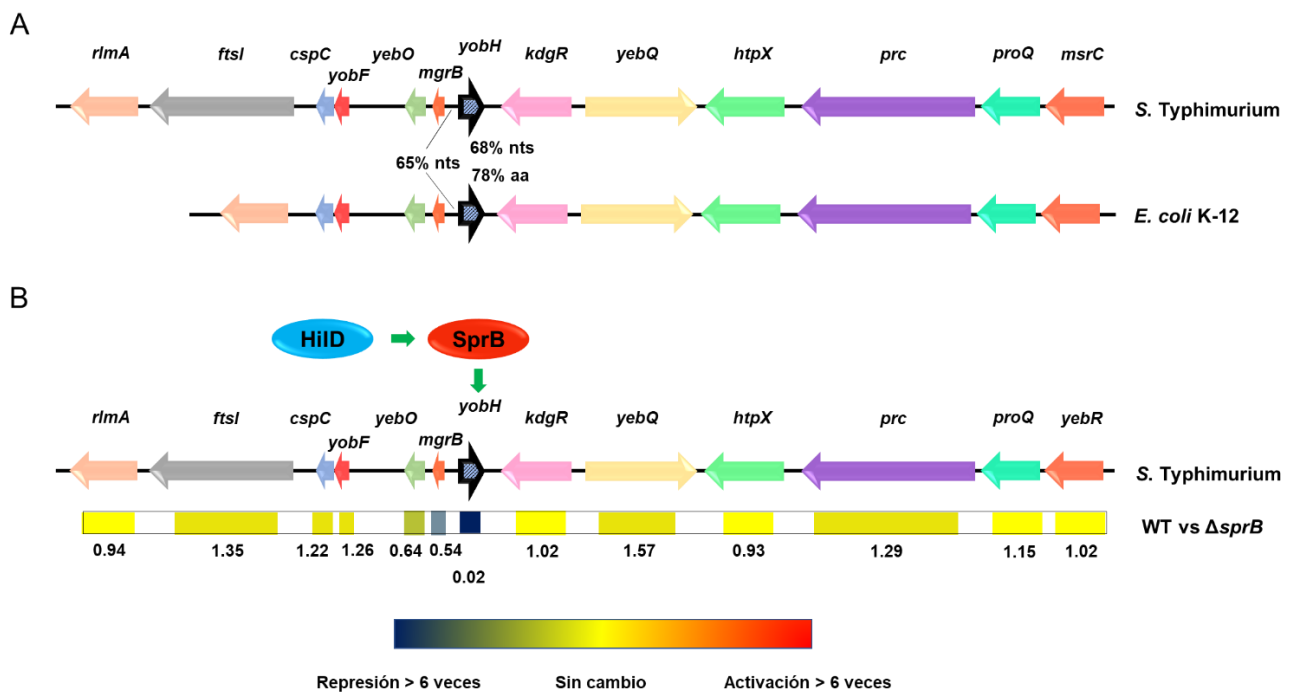


Fig. 13. El contexto genómico de *yobH* está conservado en *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12. (A) Representación esquemática del contexto genómico de los genes *yobH* de *S. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* K-12 MG1655. (B) Representación de la expresión génica del contexto genómico de $yobH_{STm}$ de la mutante isogénica *S. Typhimurium* $\Delta sprB$ ($\Delta sprB$) respecto a WT *S. Typhimurium*. Los datos de expresión génica proceden de estudios combinados de Chip-seq y RNA-seq (Smith et al., 2016).

Para determinar si $yobH_{STm}$ se expresa durante la infecciones en ratones, construimos una fusión transcripcional *yobH-lux* y analizamos su expresión en las cepas WT *S. Typhimurium* y en su

mutante isogénica $\Delta sprB$, transformadas con el vector pWSK129 o el plásmido pSprB-sprB que expresa a SprB a partir de su propio promotor. Los ratones C57BL/6 se alimentaron por vía oral con estas cepas y la luminiscencia se cuantificó mediante imágenes *in vivo* cada hora durante 6 h después de la infección. La expresión de la fusión *yobH-lux* se indujo en la cepa WT (WT + vector) en los diferentes tiempos probados, mientras que en la mutante $\Delta sprB$ + vector la expresión se abatió casi por completo (Fig 14C). Además, la luminiscencia abdominal total, producto de la expresión de *yobH-lux*, se pudo restaurar en la cepa $\Delta sprB$ + *sprB* a niveles incluso superiores a los alcanzados en la cepa silvestre (Fig. 14C), lo que muestra que *yobH_{STm}* se expresa y regula por SprB, durante el curso de la infección intestinal de *S. Typhimurium* en un modelo de ratón.

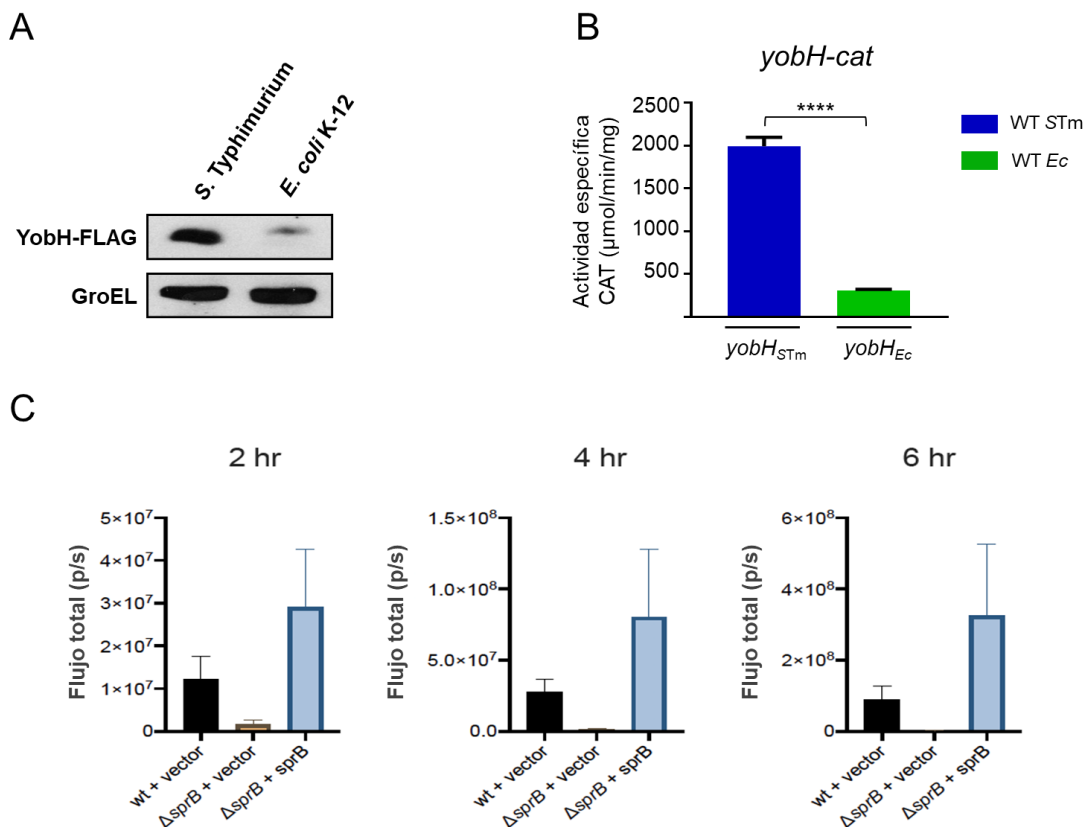


Fig. 14. *yobH_{STm}* se expresa en condiciones relevantes para la virulencia de *S. Typhimurium*. (A) La expresión cromosómica de *YobH_{STm}*-FLAG y *YobH_{Ec}*-FLAG en *S. Typhimurium* y *E. coli* MC4100 respectivamente, se analizó mediante Western blot en LB a 37 °C utilizando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control de carga, la expresión de GroEL se determinó utilizando anticuerpos policlonales anti-

GroEL. (B) La expresión de las fusiones transcripcionales *yobH_{STm}-cat* y *yobH_{Ec}-cat*, contenidas en los plásmidos *pyobH_{STm}-cat* y *pyobH_{Ec}-cat* respectivamente, se analizó en las cepas WT *S. Typhimurium* y *E. coli* MC4100, respectivamente, en LB a 37 °C. La actividad específica CAT se determinó en muestras recolectadas de cultivos bacterianos cultivados durante 9 h. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se muestran diferencias estadísticamente significativas (****, $P < 0,0001$). (C) La actividad luciferasa expresada a partir de la fusión *yobH-lux* se midió mediante imágenes de animales vivos. Los ratones C57BL/6 fueron alimentados por vía oral con las cepas indicadas. Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes y los datos se muestran como la media con el error estándar en cada punto de tiempo de cuatro animales separados.

En conjunto, estos resultados muestran que *yobH_{STm}* se expresa en condiciones relevantes para la virulencia de *S. Typhimurium*, tanto *in vitro* como *in vivo*; y que la regulación mediada por SprB juega un papel importante en la expresión de *yobH_{STm}* durante la infección intestinal.

9.2.2. Los genes *yobH_{STm}* y *yobH_{Ec}* conservan los elementos *cis*-regulatorios que median la regulación por SprB

Para tratar de dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la adaptación de la regulación de *yobH_{STm}* por SprB, analizamos más en detalle las regiones intergénicas corriente arriba de los genes *yobH_{STm}* y *yobH_{Ec}*, en busca de posibles secuencias promotoras y de las secuencias que determinan la regulación de *yobH_{STm}* por SprB (Fig. 15A). Después de analizar dichas regiones, decidimos evaluar la expresión de tres fusiones transcripcionales con mismo extremo 3' pero diferente extremo 5' de *yobH_{STm}* (*yobH_{STm}-193+10-cat*, *yobH_{STm}-61+10-cat* y *yobH_{STm}-33+10-cat*), en la cepa WT de *S. Typhimurium* (WT *STm*) y en la mutante Δ *sprB* conteniendo el vector pMPM-K6 (Δ *sprB*+vector) o el plásmido pK6-SprB (Δ *sprB*+pK6-SprB); que expresa a SprB bajo un promotor inducible con arabinosa. Interesantemente, las fusiones que abarcan de -193 a +10 y -61 a +10 mantuvieron una expresión similar a la fusión completa *yobH_{STm}-cat* (-193 a +113) en la cepa WT, igualmente disminuyeron su expresión alrededor de 4 veces en la mutante Δ *sprB*+vector y sus expresiones se restauraron en la cepa complementada Δ *sprB*+pK6-SprB (Fig. 15B). En contraste, la

fusión que abarca de -33 a +10 no se expresó en ninguna de las cepas probadas, lo cual podría indicar que la región contenida en esta fusión no lleva completo el promotor de *yobH_{STm}* (Fig. 15B). Estos resultados indican que en la región localizada entre las posiciones -61 y +10 de *yobH_{STm}* se encuentra la secuencia necesaria para la expresión y regulación mediada por SprB.

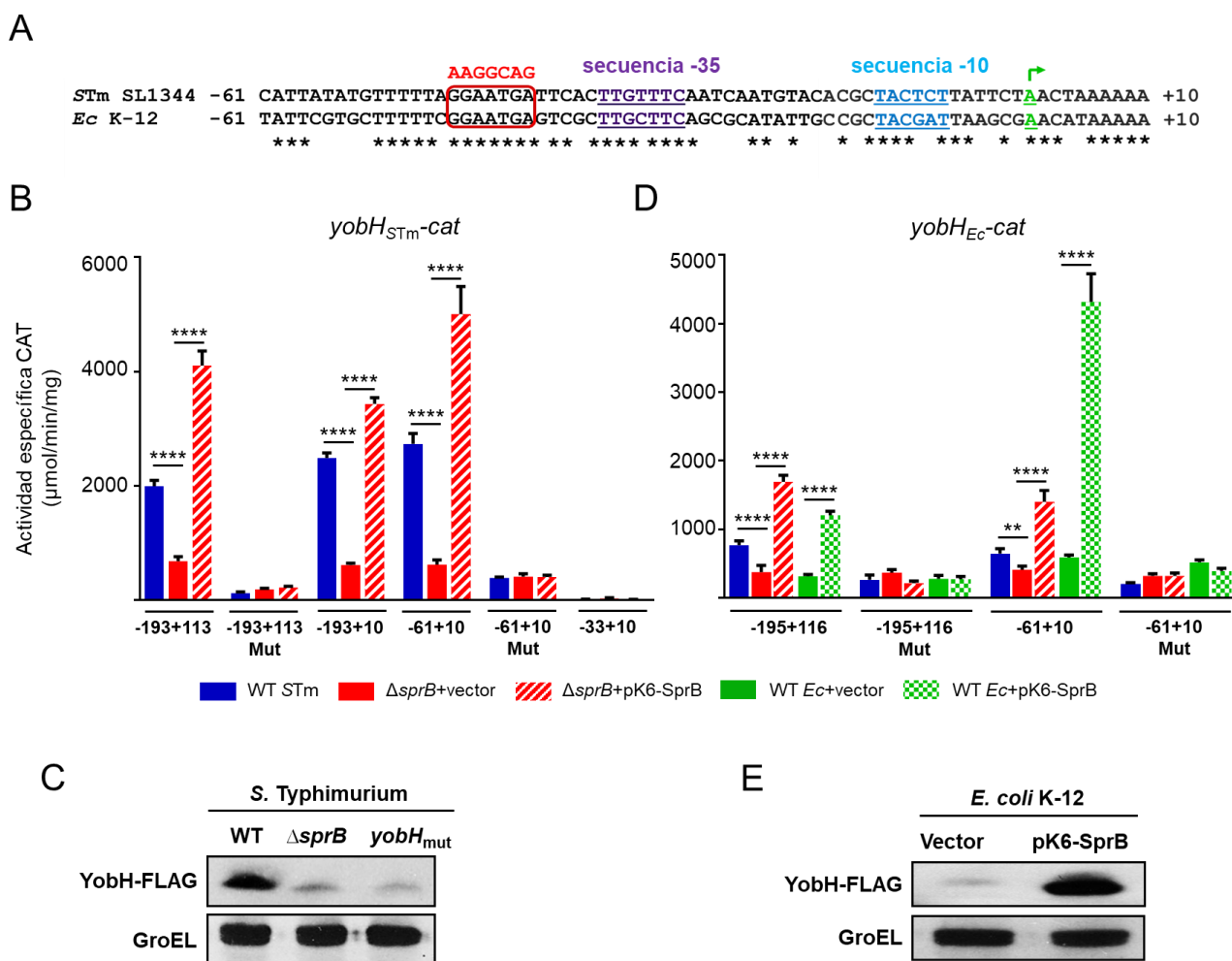


Fig. 15. *yobH_{STm}* y *yobH_{Ec}* son regulados por SprB. (A) Esquema de la región reguladora del gen *yobH* de *S. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* K-12 MG1655. Las secuencias promotoras predichas están marcadas; así como el sitio regulador de SprB (rojo) y la secuencia por la que fue mutada (arriba). (B) La expresión de las fusiones *yobH_{STm}-cat* (-193+113), *yobH_{STm}-mut-cat* (-193+113Mut), *yobH_{STm}-193+10-cat*, *yobH_{STm}-61+10-cat*, *yobH_{STm}-61+10mut-cat* y *yobH_{STm}-33+10-cat* se evaluó en las cepas WT de *S. Typhimurium* (WT STm) y en su mutante isogénica $\Delta sprB$ conteniendo el vector pMPM-K6 ($\Delta sprB$ +vector) o el plásmido pK6-SprB ($\Delta sprB$ +pK6-SprB), en medio LB después de 9 h de crecimiento. La expresión de SprB a partir del plásmido pK6-SprB se indujo con L-arabinosa al 0,001 % añadida al medio al comienzo de los cultivos. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se muestran diferencias estadísticamente significativas (****, $P < 0,0001$). (C) La expresión cromosómica de la proteína YobH-FLAG de *S. Typhimurium* se analizó

mediante Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG, en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en la mutante $\Delta sprB$ y en la cepa *S. Typhimurium-yobHmut* (contiene mutado el sitio de regulación de SprB) en medio LB a 37 °C. Como control de carga, se detectó la expresión de la proteína GroEL con un anticuerpo policlonal anti-GroEL. (D) La expresión de las fusiones *yobH_{Ec}-cat* (-195+116), *yobH_{Ec-mut}-cat* (-195+116 Mut), *yobH_{Ec}-61+10-cat* y *yobH_{Ec}-61+10mut-cat* se evaluó en las cepas WT de *S. Typhimurium* y en la mutante $\Delta sprB$ que contiene el vector pMPM-K6 ($\Delta sprB$ +vector) o el plásmido pK6-SprB ($\Delta sprB$ +pK6-SprB); así como en la cepa WT de *E. coli* MC4100 que contiene el vector pMPM-K6 (WT *Ec*+vector) o el plásmido pK6-SprB (WT *Ec*+pK6-SprB) en medio LB después de 9 h de crecimiento. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se muestran diferencias estadísticamente significativas (**, $P = 0,0054$; ****, $P < 0,0001$). (E) La expresión cromosómica de la proteína YobH-FLAG de *E. coli* se analizó mediante Western blot con un anticuerpo monoclonal anti-FLAG, en las cepas WT *Ec*+vector (pMPM-K6) y WT *Ec*+pK6-SprB en medio LB a 37°C. Como control de carga se detectó la expresión de la proteína GroEL con un anticuerpo policlonal anti-GroEL.

Sorpresivamente, al analizar la fusión *yobH_{Ec}-cat* (-195 a +116) en las mismas cepas de *S. Typhimurium*, notamos que también disminuyó su expresión (2 veces) en la cepa $\Delta sprB$ +vector respecto a la cepa WT, la cual se restauró en la cepa $\Delta sprB$ +pK6-SprB (Fig. 15D). De igual manera, la expresión de esta fusión se indujo más de 3 veces en una cepa de *E. coli* complementada con el plásmido pK6-SprB (WT *Ec*+pK6-SprB) respecto a la cepa WT *Ec*+vector (Fig. 15D). Coincidentemente, la proteína YobH_{Ec}-FLAG aumentó su expresión en la cepa WT *Ec*+pK6-SprB en comparación a la cepa WT *Ec*+vector (Fig. 15E). Estos resultados indican que los elementos en *cis* necesarios para la regulación por SprB están conservados en *yobH_{Ec}*. De igual manera que para el gen *yobH_{STm}*, en la secuencia entre las posiciones -61 a +10 se encontraron todos los elementos necesarios para la máxima expresión y regulación de *yobH_{Ec}* por SprB (Fig. 15D).

Posteriormente, analizamos la región -61/+10 de los genes *yobH* de ambas bacterias y notamos que hay una secuencia de 7 nucleótidos idénticos (GGAATGA) en las posiciones -46 a -40 (Fig. 15A). Decidimos entonces cambiar esta secuencia en las fusiones *yobH_{STm}-193+113-cat* y *yobH_{STm}-61+10-cat*. Las dos fusiones resultantes (*yobH_{STm}-193+113mut-cat* y *yobH_{STm}-61+10mut-cat*, respectivamente) mostraron niveles de expresión menores que los de las fusiones silvestres en WT *STm* (Fig. 15B). Asimismo, los niveles de expresión de las fusiones mutadas fueron similares en las cepas WT *STm*, $\Delta sprB$ +vector y $\Delta sprB$ +pK6-SprB (Fig. 15B). Sin embargo, los niveles de expresión

de las fusiones mutadas fueron ligeramente menores a los de las fusiones silvestres en la mutante $\Delta sprB$ +vector, por lo que estas mutaciones, además de interrumpir la regulación por SprB, pudieran estar afectando en parte el promotor de *yobH*_{STm} (Fig. 15B). De igual manera, la expresión de la proteína YobH_{STm}-FLAG disminuyó en una cepa que contiene los 7 nucleótidos mutados en el cromosoma (*S. Typhimurium-yobH*_{mut}) respecto a la cepa WT; la expresión de YobH_{STm}-FLAG disminuyó de manera similar en las mutantes *S. Typhimurium-yobH*_{mut} y $\Delta sprB$ (Fig. 15C). Mutaciones de los 7 nucleótidos conservados en *S. Typhimurium* y *E. coli*, afectaron también la expresión de las fusiones de *E. coli yobH*_{Ec-cat} (*yobH*_{Ec-mut-cat}) y *yobH*_{Ec-61+10-cat} (*yobH*_{Ec-61+10mut-cat}) (Fig. 15D).

En conjunto, estos resultados demuestran que la adaptación de la regulación de *yobH*_{STm} por HilD-SprB ocurrió con la adquisición por transferencia horizontal de SPI-1, que codifica para HilD y SprB, y no por cambios en la región reguladora del gen *yobH*_{STm} respecto a *yobH*_{Ec}.

9.2.3. La regulación de *yobH* por SprB se requiere para la función de YobH en la adhesión e invasión de *S. Typhimurium* a células HeLa

Con el objetivo de comprobar si la adaptación de la regulación de *yobH* por SprB es importante para la función de YobH en la invasión de *S. Typhimurium*; realizamos ensayos de invasión a células HeLa. Nuestros resultados mostraron que en la cepa *S. Typhimurium-yobH*_{mut} (contiene mutado el sitio de regulación de SprB en el cromosoma) disminuyó aproximadamente 2 veces la capacidad de invadir, respecto a la cepa WT, disminución similar a la que se produjo en la cepa $\Delta yobH$; mientras que en la cepa $\Delta yobH$ +*yobH*, complementada en el cromosoma con el gen *yobH* silvestre, se pudieron recuperar los porcentajes de invasión (Fig. 16A).

La adhesión a las células huésped es un paso previo e indispensable para la invasión de *S. Typhimurium* (Fàbrega and Vila, 2013; Zierler and Galan, 1995). Por ello realizamos ensayos de

adhesión a células HeLa utilizando como control una cepa no invasiva de *S. Typhimurium* $\Delta invC$ ($\Delta invC$) (Klein et al., 2017). Interesantemente, una doble mutante $\Delta invC \Delta yobH$ disminuyó aproximadamente a la mitad su adhesión a células HeLa, mismo efecto que se observó en la doble mutante complementada con el gen *yobH* mutado en el sitio de regulación de SprB ($\Delta invC \Delta yobH+yobH_{mut}$) (Fig. 16B). Cuando la cepa $\Delta invC \Delta yobH$ se complementó con el gen *yobH* silvestre se pudo reestablecer la adhesión a niveles similares a los de $\Delta invC$ (Fig. 16B).

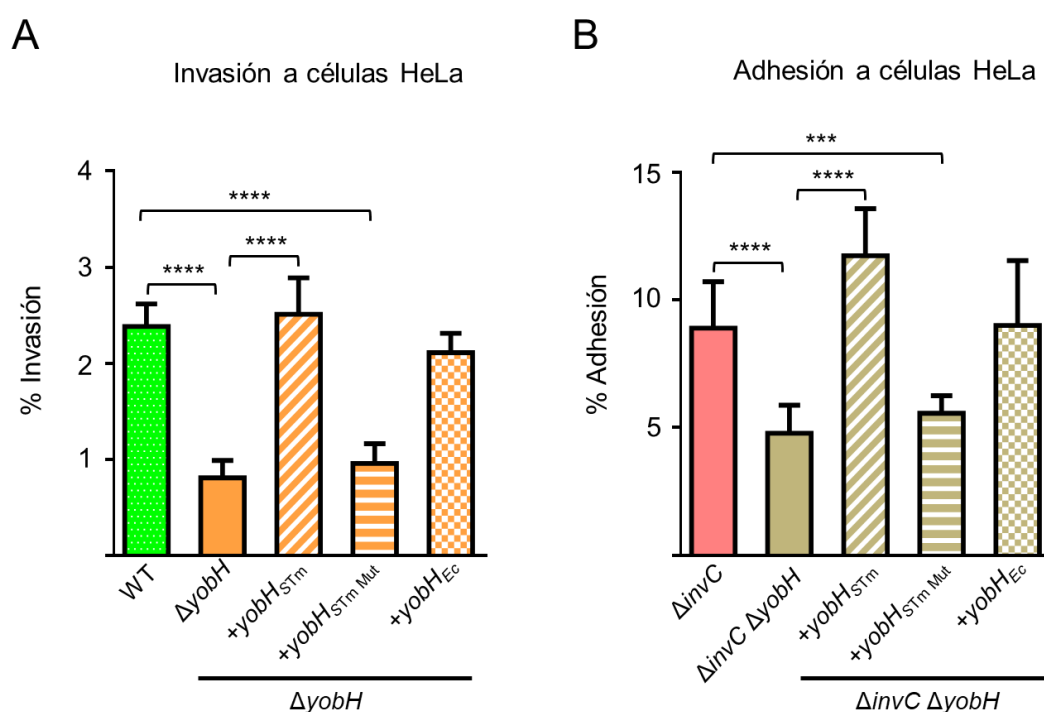


Fig. 16. La regulación de *yobH* mediada por SprB interviene en la adhesión e invasión de *S. Typhimurium* a células HeLa. (A) Células HeLa fueron infectadas con las cepas WT de *S. Typhimurium* (WT) y sus mutantes $\Delta yobH$, $\Delta yobH+yobH-FLAG-kan$ ($\Delta yobH+yobH_{STM}$), $\Delta yobH+yobH_{mut}-FLAG-kan$ ($\Delta yobH+yobH_{STM Mut}$) y $\Delta yobH+yobH_{Ec}-FLAG-kan$ ($\Delta yobH+yobH_{Ec}$). La invasión se cuantificó por el conteo de UFCs intracelulares después de 1h pos-infección mediante el ensayo de protección a gentamicina. (B) Células HeLa fueron infectadas con las cepas no invasivas de *S. Typhimurium*: $\Delta invC$, $\Delta invC \Delta yobH$, $\Delta invC \Delta yobH+yobH-FLAG-kan$ ($\Delta invC \Delta yobH+yobH_{STM}$), $\Delta invC \Delta yobH+yobH_{mut}-FLAG-kan$ ($\Delta invC \Delta yobH+yobH_{STM Mut}$), and $\Delta invC \Delta yobH+yobH_{Ec}-FLAG-kan$ ($\Delta invC \Delta yobH+yobH_{Ec}$). La adhesión se cuantificó por el conteo de UFCs 30min pos-infección. Los porcentos de invasión y adhesión se calcularon en relación con el total de bacterias de cada cepa (inóculo). Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se muestran diferencias estadísticamente significativas (***, $P = 0,0006$; ****, $P < 0,0001$).

Estos resultados demuestran que *yobH* actúa como un factor de adhesión de *S. Typhimurium* durante la invasión a células epiteliales HeLa y que la regulación mediada por SprB es requerida para llevar a cabo dicha función.

Por otra parte, como el gen *yobH* de *E. coli* también puede ser regulado por SprB, decidimos realizar los ensayos de invasión y adhesión complementando las cepas $\Delta yobH$ y $\Delta invC \Delta yobH$ con el gen *yobH_{Ec}* ($\Delta yobH+yobH_{Ec}$ y $\Delta invC \Delta yobH+yobH_{Ec}$, respectivamente). Interesantemente, los porcentajes de invasión y adhesión pudieron restaurarse de igual manera que cuando se complementó con el gen *yobH* silvestre de *S. Typhimurium* (Fig. 16A y B), demostrando que la proteína YobH de *E. coli* conserva la actividad requerida para la adhesión e invasión de *S. Typhimurium* a células hospederas.

9.2.4. La actividad de YobH no se requiere durante la infección de *S. Typhimurium* en ratones

Nuestros resultados muestran que la regulación de *yobH_{STm}* por SprB es necesaria para la función de YobH en la adherencia e invasión de *S. Typhimurium* a sus células hospederas. Esto nos llevó a analizar si el reclutamiento de la regulación de *yobH* por SprB es igualmente importante en el establecimiento de la infección en ratones. Para ello, se analizó la infección causada por las cepas WT de *S. Typhimurium*, la mutante $\Delta yobH$ y las mutantes complementadas $\Delta yobH+yobH_{STm-FLAG-kan}$ ($\Delta yobH+yobH$) y $\Delta yobH+yobH_{STm-mut-FLAG-kan}$ ($\Delta yobH+yobH_{MUT}$), en un modelo de colitis en ratón. Contrario a lo esperado, ni la ausencia de YobH_{STm}, ni la pérdida de su regulación por SprB causaron una atenuación de la infección intestinal o sistémica de *S. Typhimurium* en los ratones; ya que las cantidades de UFCs recuperadas de las cepas $\Delta yobH$ y $\Delta yobH+yobH_{MUT}$ fueron similares a las de las cepas WT y $\Delta yobH+yobH$ en el íleon, ciego, colon y el bazo (Fig. 17A). De igual manera, la

expresión de la interleucina proinflamatoria 6 (*il6*) y la proteína de defensa antibacteriana LCN2 (*lcn2*) fue similar en los ratones infectados con la cepa WT y con las cepas $\Delta yobH$ complementadas (Fig. 17B). Estos resultados sugieren que la actividad de YobH no interviene en el establecimiento de la infección de *S. Typhimurium* en el modelo de ratón. Sin embargo, estudios similares deben realizarse en otros modelos animales empleados en el estudio de la infección causada por *Salmonella*.

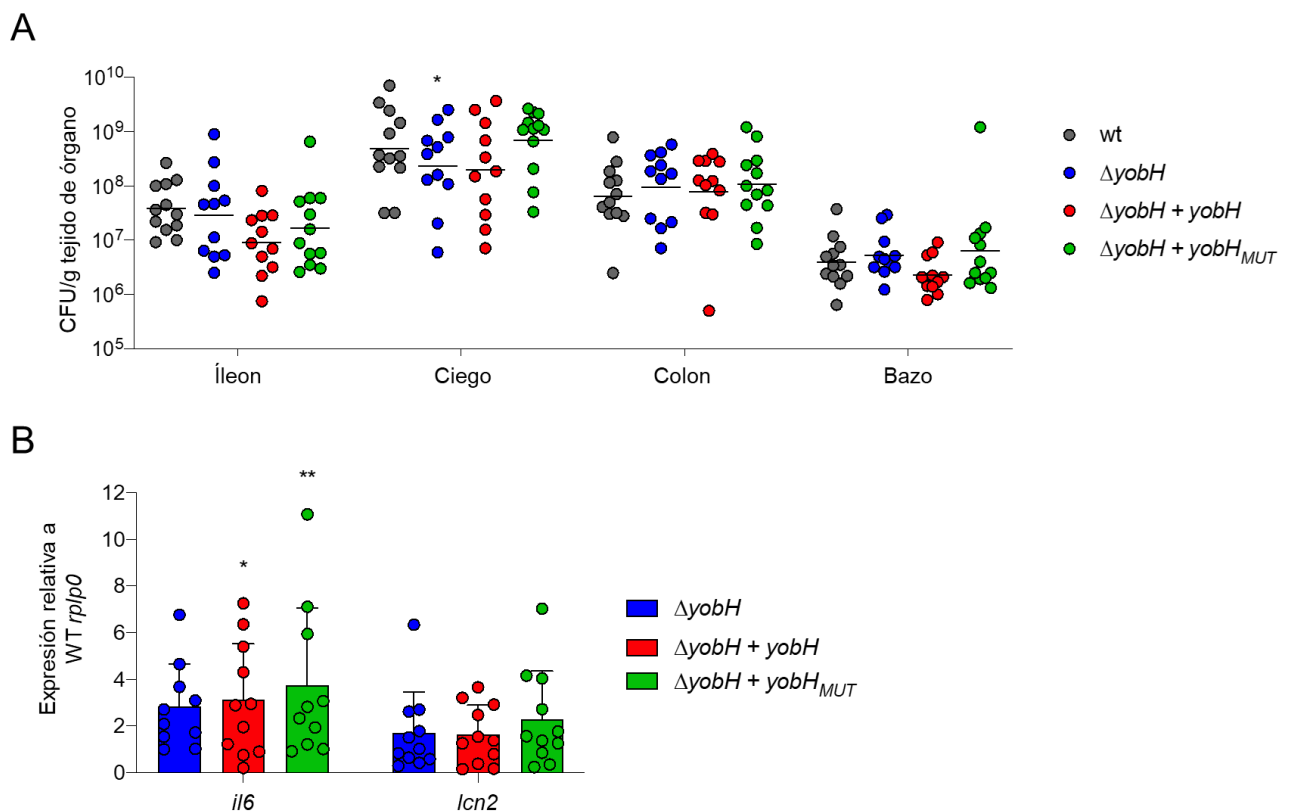


Fig. 17. YobH y su regulación por SprB no intervienen en la infección de *S. Typhimurium* en un modelo de colitis en ratón. (A) Ratones pretratados con estreptomicina fueron infectados con las cepas WT de *S. Typhimurium* (wt), $\Delta yobH$, $\Delta yobH+yobH$, o $\Delta yobH+yobH_{MUT}$. Los ratones fueron sacrificados cuatro días después de ser infectados y el número de UFCs recuperadas por gramo de tejido fue calculado en cada ratón. Cada punto representa un animal individual, las líneas indican la geometría de cada grupo. Dentro de cada tejido, las cepas se compararon mediante un ANOVA de dos vías respecto a la cepa wt y se corrigieron para comparaciones múltiples con la prueba de Bonferroni. *, $P < 0,05$. (B) La expresión de los genes *il6* y *lcn2* de las muestras de tejido de cada ratón se midió mediante RT-qPCR, después de la infección. La expresión del gen *rplp0* se midió para la normalización. Las proporciones, normalizadas a la cepa wt, se calcularon en relación con los niveles de transcripción de *rplp0*. Cada punto representa un animal individual, las barras y el error indican la media y la desviación estándar de cada grupo. Los grupos se compararon contra un valor de 1 a través

de un ANOVA de dos vías y se corrigieron para comparaciones múltiples con la prueba de Bonferroni *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

9.3. Adaptación de la regulación transcripcional de *fdnG* mediada por HilD

9.3.1. El gen *fdnG* de *S. Typhimurium*, pero no el gen de *E. coli* K-12, es regulado por HilD en condiciones inductoras de SPI-1

fdnGHI es un operón ancestral con ortólogos en una gran variedad de bacterias mayormente pertenecientes a la clase Gammaproteobacteria, que codifica a la enzima formiato deshidrogenasa-N (Fdn-N), involucrada en la oxidación y transporte electrónico del formiato al nitrato durante la respiración anaerobia (Martinez-Guerrero et al., 2008; Wang and Gunsalus, 2003). Sin embargo, estudios previos de transcriptómica global sugieren que en *S. Typhimurium* se adaptó específicamente la regulación de *fdnGHI* por HilD, un regulador adquirido y exclusivo de *Salmonella* (Colgan et al., 2016) (Fig. 18B). El contexto genómico de *fdnGHI* está conservado en dos bacterias relacionadas evolutivamente, como lo son *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12, a excepción de algunos genes específicos de cada bacteria que se encuentran en la región entre los genes *narU* y *yddG* (Fig. 18A). Particularmente, el primer gen del este operón, *fdnG*, y su proteína codificada FdnG, presentan una identidad en secuencia del 86% y 93%, respectivamente, entre *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12; mientras que las regiones intergénicas corriente arriba de ambos genes solo guardan un 56% de identidad (Fig. 18A).

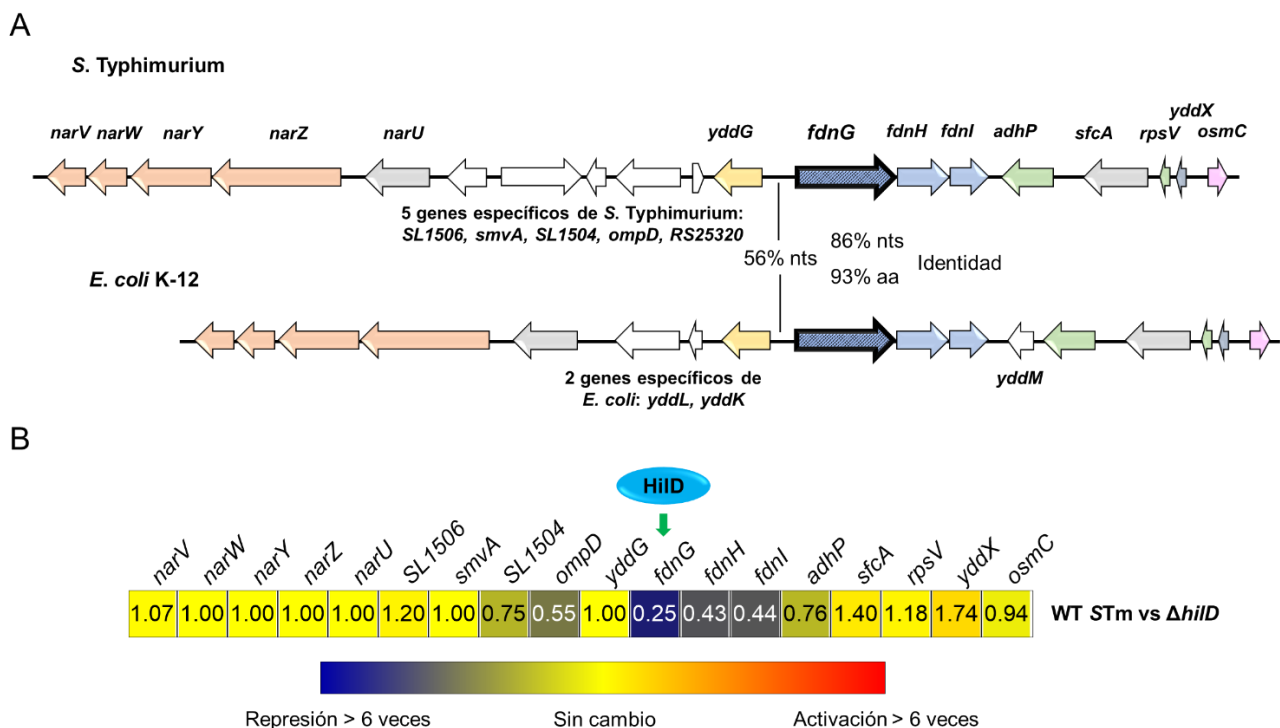


Fig. 18. El contexto genómico de *fdnG* está conservado en *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12. (A) Representación esquemática del contexto genómico de los genes *fdnG* de *S. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* K-12 MG1655. Los genes ortólogos se representan con el mismo color. Se muestran la identidad de secuencia de los genes *fdnG* y las proteínas FdnG de ambas bacterias, y de las regiones intergénicas corriente arriba. (B) Representación de la expresión génica del contexto genómico de *fdnG*_{STm} de la mutante isogénica *S. Typhimurium* Δ *hilD* (Δ *hilD*) respecto a WT *S. Typhimurium* (WT STm). Los datos de expresión génica proceden de estudios de RNA-seq (Colgan et al., 2016).

Tomando en cuenta que HilD es un regulador adquirido por *Salmonella* y ausente en *E. coli*, y que el contexto genómico de *fdnG* en ambas bacterias está conservado, nos preguntamos si además de la ganancia de HilD, fueron necesarios cambios *cis*-regulatorios que fijaran la regulación de *fdnG* por HilD en *S. Typhimurium*. Para determinar esto se construyeron dos fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, que abarcan las regiones intergénicas corriente arriba de los genes *fdnG* de *S. Typhimurium* (*fdnG*_{STm}-*cat*) y *E. coli* (*fdnG*_{Ec}-*cat*), respectivamente, y se analizaron sus expresiones en condiciones inductoras de SPI-1. La expresión de la fusión *fdnG*_{STm}-*cat* se evaluó en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* (WT STm) y en una cepa silvestre de *E. coli* transformada con el vector pMPM-K6 (WT *Ec*+vector) o el plásmido pK6-HilD (WT *Ec*+pK6-HilD), que expresa HilD a partir de un

promotor inducible por arabinosa. La expresión de la fusión *fdnG_{STm}-cat* se indujo en la cepa WT *STm*, mientras que en la cepa WT *Ec*+vector se redujo su expresión alrededor de 4 veces, consistente con estudios anteriores que refieren la regulación positiva de HilD sobre *fdnG_{STm}* (Colgan et al., 2016) (Fig. 19A). La expresión de HilD a través del plásmido pK6-HilD incrementó la expresión de la fusión *fdnG_{STm}-cat* a niveles similares a los de la cepa WT de *S. Typhimurium* (Fig. 19A), lo que sugiere que la expresión de *fdnG_{STm}* mediada por HilD no requiere otro regulador específico de *Salmonella*. Por otra parte, la expresión de la fusión *fdnG_{Ec}-cat* se analizó de igual manera en las cepas WT *Ec*+vector y WT *Ec*+pK6-HilD. Sin embargo, los niveles de expresión resultaron muy bajos en comparación a los de la fusión *fdnG_{STm}-cat*, incluso en presencia del plásmido pK6-HilD, lo que indica que el gen *fdnG* de *E. coli* no es regulado por HilD en las condiciones evaluadas (Fig. 19A). Luego de observar la pobre expresión de la fusión *fdnG_{Ec}-cat* en LB, quisimos descartar la posibilidad de que faltaran secuencias reguladoras en la fusión transcripcional que habíamos construido. Por esto, evaluamos ambas fusiones en condiciones que han sido reportadas como inductoras de *fdnG_{Ec}*, esto es crecimiento en anaerobiosis en medio mínimo N (MM-N) y en presencia de nitrato (NaNO₃) (Wang and Gunsalus, 2003). En dichas condiciones, las fusiones *fdnG_{STm}-cat* y *fdnG_{Ec}-cat* aumentaron significativamente sus expresiones en comparación a cuando no se añadió NaNO₃ al medio de cultivo (Fig. 19B). Lo anterior indica que ambas fusiones cuentan con las regiones reguladoras necesarias para su expresión y regulación ancestral por nitrato y anaerobiosis.

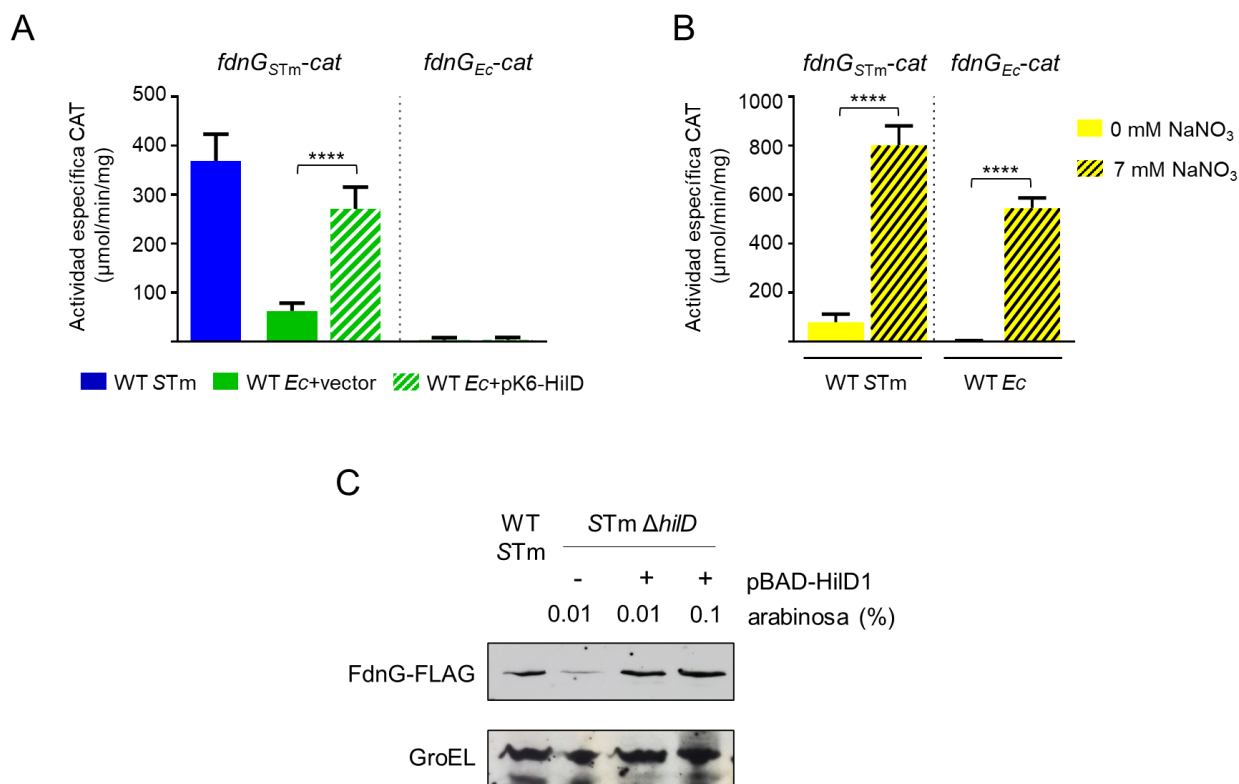


Fig. 19. *fdnG_{STm}*, pero no *fdnG_{Ec}*, se expresa y regula por HilD en condiciones inductoras de SPI-1. (A) La actividad CAT de la fusión *fdnG_{STm}-cat* se determinó en la cepa WT *S. Typhimurium* (*STm*) y en las cepas WT *E. coli* (*Ec*) MC4100 en presencia del vector pMPM-K6 o el plásmido pK6-HilD que expresa a HilD a través de un promotor inducible por arabinosa. La actividad de la fusión transcripcional *fdnG_{Ec}-cat* se determinó en las cepas WT *E. coli* (*Ec*) MC4100 en presencia del vector pMPM-K6 o el plásmido pK6-HilD. La actividad CAT se determinaron a partir de muestras de cultivos bacterianos crecidos en LB a 37 °C durante 6 h en agitación. La expresión de HilD a partir del plásmido pK6-HilD se indujo con L-arabinosa al 0,01 % añadida al medio al comienzo de los cultivos. Se muestran diferencias estadísticamente significativas (**, $P < 0,0001$). (B) La actividad CAT de las fusiones *fdnG_{STm}-cat* y *fdnG_{Ec}-cat* se determinó en la cepa WT *STm* y WT *Ec*, respectivamente, a partir de muestras de cultivos bacterianos crecidos en medio mínimo N (MM-N) en presencia (7 mM) o ausencia (0 mM) de NaNO₃ en anaerobiosis durante 16 h. Se muestran diferencias estadísticamente significativas (****, $P < 0,0001$). (C) La expresión cromosómica de la proteína FdnG-FLAG de *S. Typhimurium* se analizó mediante Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG, en la cepa WT de *S. Typhimurium* (*STm*) y en la mutante *STm* Δ*hilD* transformada con el vector pBADMyHisC (-) o el plásmido pBAD-HilD1, que expresa HilD a partir de un promotor inducible por arabinosa. Como control, también se detectó la expresión de GroEL utilizando anticuerpos policlonales anti-GroEL. Los cultivos bacterianos se crecieron en LB a 37 °C durante 6 h en agitación, y la expresión de HilD del plásmido pBAD-HilD1 se indujo con las cantidades indicadas de L-arabinosa añadidas al medio 3 h después de la inoculación de los cultivos.**

Para confirmar la regulación de *fdnG_{STm}* por HilD, realizamos un análisis de Western blot para evaluar la expresión cromosómica de la proteína FdnG-FLAG (FdnG etiquetada con un epítipo

3XFLAG), en la cepa WT *S. Typhimurium* y en su mutante isogénica $\Delta hilD$ ($STm \Delta hilD$), transformada con el vector pBADMycHisC (-) o el plásmido pBAD-HilD1, que expresa HilD a partir de un promotor inducible por arabinosa. La proteína FdnG-FLAG de *S. Typhimurium* (FdnG_{STm}-FLAG) se detectó en menor medida en la cepa $STm \Delta hilD$ respecto a la cepa WT STm ; mientras que la expresión de HilD a partir del plásmido pBAD-HilD1 restauró la detección de FdnG_{STm}-FLAG en la mutante $\Delta hilD$ (Fig. 19C).

En conjunto, estos resultados muestran que el gen *fdnG*_{STm}, pero no el gen *fdnG*_{Ec}, es activado por HilD en condiciones inductoras de SPI-1; lo que sugiere que tanto la ganancia de HilD, como la diferenciación de la secuencia reguladora, llevaron al gen *fdnG*_{STm} a expresarse distintivamente en condiciones relevantes para la virulencia de *Salmonella*.

9.3.2. Los genes *fdnG*_{STm} y *fdnG*_{Ec} son diferencialmente regulados por el represor H-NS

Como mencionamos anteriormente, HilD induce la expresión de sus genes blanco contrarrestando la represión mediada por H-NS y en ausencia de la actividad de H-NS estos genes se expresan independientemente de HilD (Banda et al., 2019a; Bustamante et al., 2008; Olekhovich and Kadner, 2007). Quisimos determinar entonces si HilD sigue un mecanismo similar para inducir la expresión de *fdnG*_{STm}. En esta ocasión inactivamos a H-NS en *S. Typhimurium* sobreexpresando la mutante H-NS^{G113D} para generar una dominancia negativa. Esta mutante tiene afectada la unión al DNA pero aún forma heterodímeros con los monómeros H-NS WT (Ueguchi et al., 1996). Entonces, se cuantificó la actividad de la fusión *fdnG*_{STm}-*cat* en la cepa WT *S. Typhimurium* y en su mutante derivada $\Delta hilD$ que contiene los plásmidos pT6-HNS-G113D o pT6-HNS-WT, que expresan H-NS^{G113D} y H-NS WT, respectivamente, o transformada con el vector pMPM-T6. La expresión de H-NS^{G113D}, pero no de H-NS WT, aumentó la expresión de *fdnG*_{STm}-*cat* en la mutante $\Delta hilD$, a niveles incluso mayores a los alcanzados en la cepa WT STm (Fig. 20A). De manera similar, la proteína

FdnG_{STm}-FLAG incrementó su expresión en la cepa $\Delta hilD$ +pT6-HNS-G113D, respecto a la misma cepa transformada con el plásmido pT6-HNS-WT o con el vector pMPM-T6 (Fig. 20B). Estos resultados muestran que H-NS reprime la expresión de *fdnG_{STm}-cat* y que en ausencia de la actividad de H-NS este gen se expresa independientemente de HilD, lo que apoya la idea que HilD induce la expresión de *fdnG_{STm}* contrarrestando la represión mediada por H-NS. Por el contrario, la fusión *fdnG_{Ec}-cat* mostró niveles de expresión muy bajos tanto en la cepa WT *Ec*, como en la cepa Δhns *Ec* (Fig.20A), mostrando que, a diferencia de lo observado para *fdnG_{STm}*, la expresión de *fdnG_{Ec}* no se induce en ausencia de H-NS en las condiciones probadas.

En total, estos resultados apoyan que durante la diferenciación evolutiva de *Salmonella* y *E. coli* K-12 ocurrieron cambios en la región reguladora de *fdnG_{STm}*, que establecieron la represión de este gen por H-NS y la acción de HilD como un factor anti-H-NS; haciendo que *fdnG_{STm}* se exprese en condiciones relevantes para la virulencia de *Salmonella*.

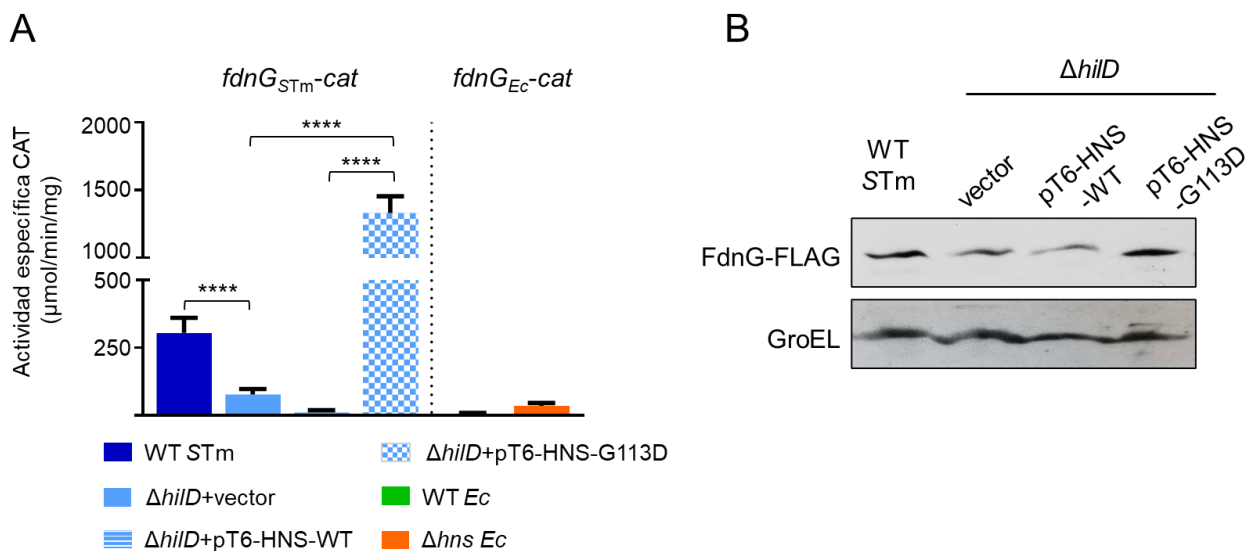


Fig. 20. HilD antagoniza la represión de H-NS sobre *fdnG_{STm}*. (A) La actividad específica CAT de la fusión *fdnG_{STm}-cat* se evaluó en la cepa WT *S. Typhimurium* (*STm*) y en su mutante derivada $\Delta hilD$ transformada con el vector pMPM-T6 ($\Delta hilD$ +vector), el plásmido pT6-HNS-WT o con el plásmido pT6-HNS-G113D, que expresan las proteínas H-NS WT y H-NS^{G113D}, respectivamente, a partir de un promotor inducible por arabinosa. La expresión de H-NS WT y H-NS^{G113D} se indujo con L-arabinosa al 0,1 % añadida al medio al comienzo de

los cultivos. La actividad de la fusión *fdnG_{Ec}-cat* se evaluó en las cepas WT *E. coli (Ec)* MC4100 y en su derivada mutante Δhns . Se muestran diferencias estadísticamente significativas (****, $P < 0,0001$). (B) La expresión cromosomal de la proteína FdnG-3XFLAG (FdnG-FLAG) de *S. Typhimurium* SL1344 se analizó mediante Western blot en la cepa WT *STm* y en su derivada mutante $\Delta hild$ transformada con el vector pMPM-T6, el plásmido pT6-HNS-WT o con el plásmido pT6-HNS-G113D. Como control de carga se analizó la expresión de la proteína GroEL. La actividad CAT y la expresión de FdnG-FLAG se determinaron a partir de muestras de cultivos bacterianos crecidos en LB a 37 °C durante 6 h en agitación.

10. DISCUSIÓN

La regulación diferencial de genes ortólogos es un mecanismo importante para la variabilidad fenotípica entre bacterias estrechamente relacionadas (Choi and Groisman, 2020; Ilyas et al., 2018; Osborne et al., 2009; Perez and Groisman, 2009; Winfield and Groisman, 2004). En este estudio, definimos el mecanismo por el cual HilD induce la expresión de *phoH*_{STM} y *fdnG*_{STM}, y mostramos que, tanto la ganancia de HilD como cambios *cis*-regulatorios, propiciaron la regulación transcripcional de estos genes mediada por HilD en *S. Typhimurium*; lo que llevó a una expresión diferencial de *phoH* y *fdnG* entre *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12. La regulación de *phoH* y *fdnG* mediada por HilD en *S. Typhimurium* es resumida en las figuras 21 y 22, respectivamente.

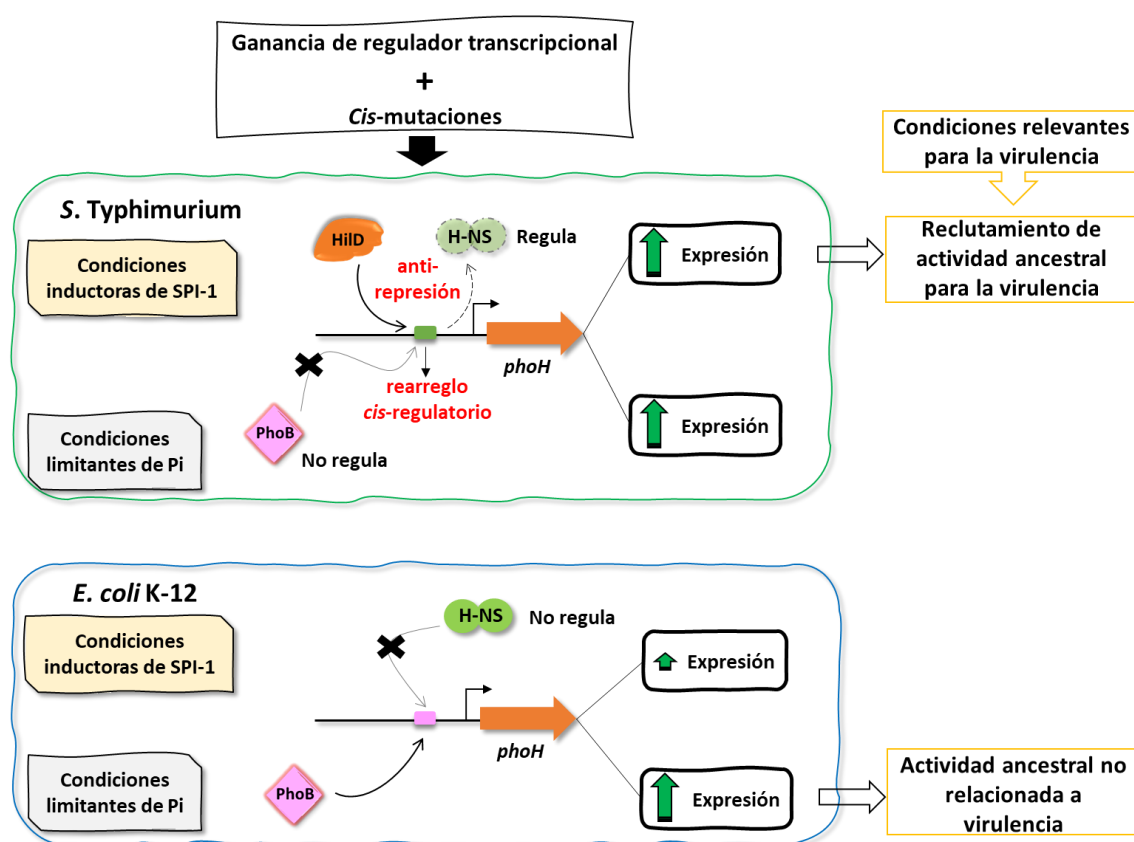


Fig. 21. Representación de la adaptación reguladora de *phoH* por HilD en *S. Typhimurium*. Se indica como la adquisición de HilD y mutaciones *cis*-reguladoras llevaron a una expresión y regulación diferencial de *phoH*_{STm} respecto a *phoH*_{Ec}.

Nuestros datos indican que en ausencia del represor H-NS, los genes *phoH*_{STm} y *fdnG*_{STm} alcanzan niveles de expresión similares a los de la cepa WT *S. Typhimurium*, independientemente de HilD. Encontramos que H-NS reprime directamente la expresión del gen *phoH*_{STm}, pero no del gen *phoH*_{Ec}. Además, determinamos que HilD desplaza a H-NS del gen *phoH*_{STm}. Igualmente, *fdnG*_{STm}, pero no *fdnG*_{Ec}, es reprimido por H-NS en condiciones inductoras de SPI-1. Estos resultados respaldan que HilD induce la expresión de *phoH*_{STm} y *fdnG*_{STm} al antagonizar el efecto negativo de H-NS, al igual que en varios otros genes blanco (Banda et al., 2019b, 2019a; Bustamante et al., 2008; Martínez et al., 2014; Olekhovich and Kadner, 2007, 2006; Schechter and Lee, 2001). Curiosamente, observamos que la sobreexpresión de HilD aumentó aún más la expresión del gen *phoH*_{STm} en ausencia de H-NS, lo que sugiere que HilD, además de actuar como un factor anti-H-NS, podría antagonizar la acción de un represor adicional o mejorar la unión de la RNA polimerasa sobre el promotor de este gen. De acuerdo con esta noción, un informe anterior indica que HilD contrarresta la represión ejercida por la proteína asociada a nucleóide Hha sobre el gen *rtsA* (Olekhovich and Kadner, 2007). Además, la evidencia de otro estudio sugiere que HilD recluta la RNA polimerasa en el promotor de *hila* (Boddicker et al., 2003).

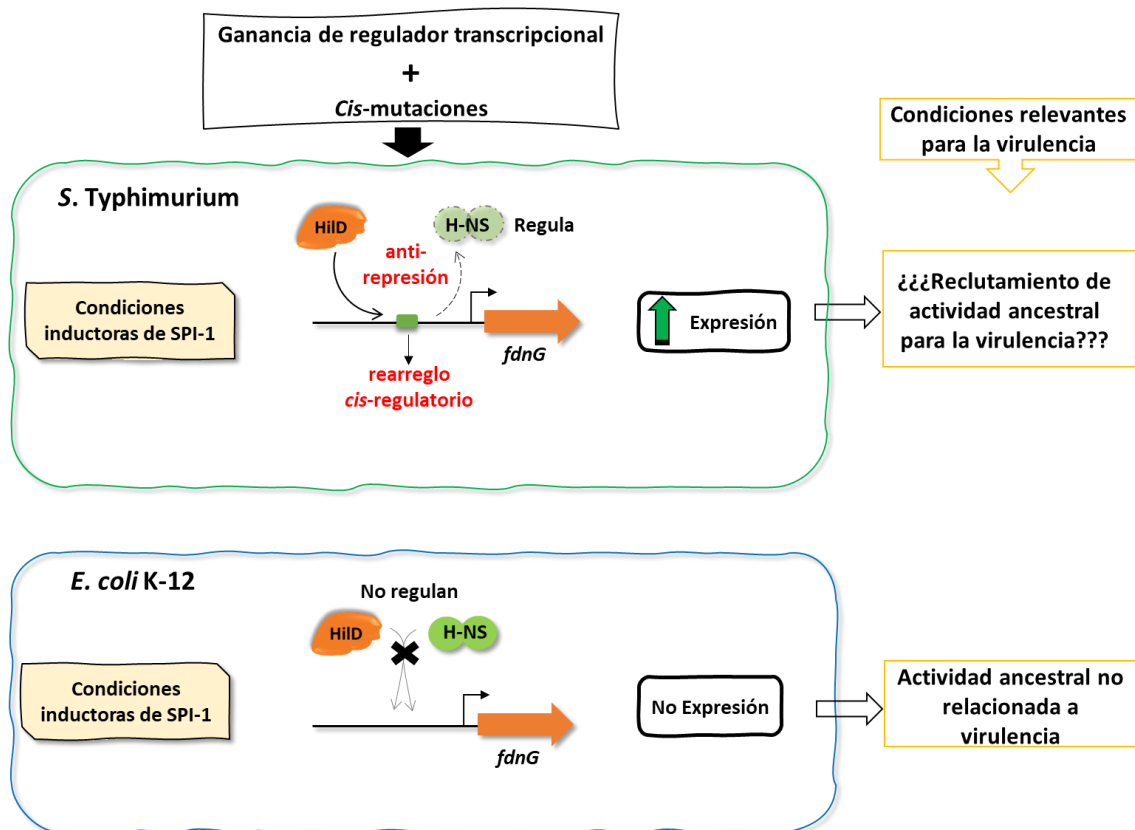


Fig. 22. Representación de la adaptación reguladora de *fdnG* por HilD en *S. Typhimurium*. Se indica como la adquisición de HilD y la evolución *cis*-reguladora llevaron a una expresión y regulación diferencial de *fdnG*_{STm} respecto a *fdnG*_{Ec}, en condiciones relevantes para la virulencia de *Salmonella*.

Un análisis previo de RNA-seq reveló dos sitios de inicio de la transcripción para el gen *phoH*_{STm} (Kröger et al., 2013; Ramachandran et al., 2014). En consecuencia, nuestros resultados muestran que dos promotores (P1 y P2) transcriben este gen en condiciones inductoras de SPI-1. Encontramos que HilD regula positivamente el promotor P1, pero no el promotor P2, al unirse a un sitio que se superpone a la región -35 del promotor P1. Hasta donde conocemos, no se ha definido ningún otro mecanismo regulador que no sea el mediado por el sistema PhoB/R para el gen *phoH* en ninguna otra bacteria.

En nuestro estudio detectamos solo niveles basales de expresión para los genes *phoH*_{Ec} y *fdnG*_{Ec} en condiciones inductoras de SPI-1, incluso en presencia de HilD. De acuerdo con este hallazgo, análisis computacionales revelaron que la secuencia reguladora requerida para la expresión del gen

*phoH*_{STm} mediada por HilD (secuencia P1 -67/+3) está poco conservada en el gen *phoH*_{Ec}, incluida la secuencia de unión a HilD en *phoH*_{STm}. Además, un análisis filogenético basado en la secuencia P1 -67/+3 de *phoH* agrupó las cepas de *Salmonella* y *E. coli* en dos clados diferentes. Por lo tanto, nuestros resultados respaldan que tanto la adquisición de HilD como la diferenciación evolutiva de la secuencia P1 -67 a +3 adaptaron la regulación positiva de *phoH* por HilD en *S. Typhimurium*, lo que llevó a que este gen se expresara en condiciones de crecimiento relevantes para la virulencia de *Salmonella*. Un análisis computacional similar predijo un sitio de regulación de HilD en *fdnG*_{STm}, pero no en *fdnG*_{Ec} (datos no mostrados); sin embargo, más estudios deben realizarse para determinar si dicha secuencia es responsable de la expresión diferencial entre *fdnG*_{STm} y *fdnG*_{Ec}.

Curiosamente, la diferenciación de la región reguladora de *phoH*_{STm} y *fdnG*_{STm} también adaptó la represión de estos genes por H-NS, que a su vez está involucrada en sus expresión mediada por HilD. Esto nos lleva a especular que la regulación por parte de HilD de otros genes ancestrales, como *flhDC*, también fue adaptada mediante una evolución *cis*-reguladora. Por otro lado, cambios *cis*-reguladores en *S. Typhimurium* con respecto a *S. bongori* llevaron a que los genes *srfN*, *ugtL* y *flhDC* fueran regulados por el regulador transcripcional de SPI-2, SsrB, y por lo tanto, tuvieran un papel en la virulencia de *S. Typhimurium* (Choi and Groisman, 2020; Ilyas et al., 2018; Osborne et al., 2009). Así, estos estudios indican que los cambios *cis*-regulatorios han jugado un papel importante en la evolución de la patogenicidad de *Salmonella*. Es razonable pensar que la integración de los genes *phoH*_{STm} y *fdnG*_{STm} en el regulón de HilD fue favorable para la virulencia de *S. Typhimurium*. Nuestros resultados indican que la eliminación de *phoH*_{STm} disminuye ligeramente la colonización intestinal temprana, pero no afecta la infección sistémica de ratones por *S. Typhimurium*. Un fenotipo similar observamos con la delección del gen *siiE*, que codifica una adhesina gigante no fimbrial que se ha demostrado que es necesaria para la colonización intestinal (Gerlach et al., 2007; Morgan et al., 2004). Por el contrario, la eliminación de *phoH*_{STm} no afectó la invasión de *S. Typhimurium* a células HeLa o macrófagos murinos RAW264.7 (Valdespino-Díaz, 2018). Entonces, se requieren más estudios sobre

el posible papel de *phoH* en la patogenicidad de *S. Typhimurium*; sobre todo, teniendo en cuenta que incluso cuando *phoH* se conserva en muchas bacterias, su función biológica permanece desconocida en todas ellas. Por otra parte, nuestros resultados preliminares no muestran que *fdnG* se requiera para la invasión de *S. Typhimurium* a células HeLa (datos no mostrados). Sabiendo la función de la enzima formiato deshidrogenasa-N en la oxidación y transporte de electrones del formiato al nitrato, y la ventaja adaptativa que la respiración del nitrato le genera a *S. Typhimurium* en el intestino inflamado de ratones (Lopez et al., 2015, 2012; Rivera-Chávez et al., 2016, 2013); resulta fundamental entonces analizar el papel de *fdnG* durante la colonización intestinal de *S. Typhimurium* en ratones u otros modelos animales, para determinar si su función ancestral ha sido reclutada para la virulencia.

Adicional a la adaptación de la regulación por HilD y H-NS, encontramos otro rasgo en *phoH_{STm}* que también fue generado por la evolución *cis*-reguladora; la expresión de este gen fue inducida por bajo Pi independientemente del sistema de dos componentes PhoR/B. Un trabajo anterior indica que solo una pequeña parte de los genes de *S. Typhimurium* que son inducidos por bajo Pi pertenecen al regulón del sistema PhoR/B (Jiang et al., 2018). Por lo tanto, *S. Typhimurium* parece tener un sistema regulador alternativo a PhoR/B para activar *phoH_{STm}* y muchos otros genes en respuesta a la limitación de Pi. Nuestros resultados indican que HilD, así como PhoP y SsrB, dos reguladores transcripcionales que inducen la expresión de genes de virulencia de *Salmonella* en MM-N con bajo Pi, no están involucrados en la activación de *phoH_{STm}* en esas condiciones (Valdespino-Díaz, 2018). Estudios transcriptómicos han demostrado que la expresión de *phoH_{STm}* es inducida por varios tipos de estrés que *S. Typhimurium* enfrenta dentro de los huéspedes, tales como alta concentración de NaCl, bajo Fe²⁺, anaerobiosis, exposición a peróxido u óxido nítrico, entre otros (Kröger et al., 2013). Así, varios reguladores podrían coordinarse para activar la expresión de *phoH_{STm}* en respuesta a diferentes señales, lo cual queda por determinar.

Un estudio previo de nuestro grupo demostró que HilD regula indirectamente la expresión de *yobH_{STm}* a través del regulador transcripcional SprB (Banda et al., 2019a). En el actual trabajo

mostramos que la actividad ancestral de YobH fue reclutada para la virulencia de *S. Typhimurium* a través de la regulación positiva que ejerce SprB sobre $yobH_{STm}$ (Fig. 23).

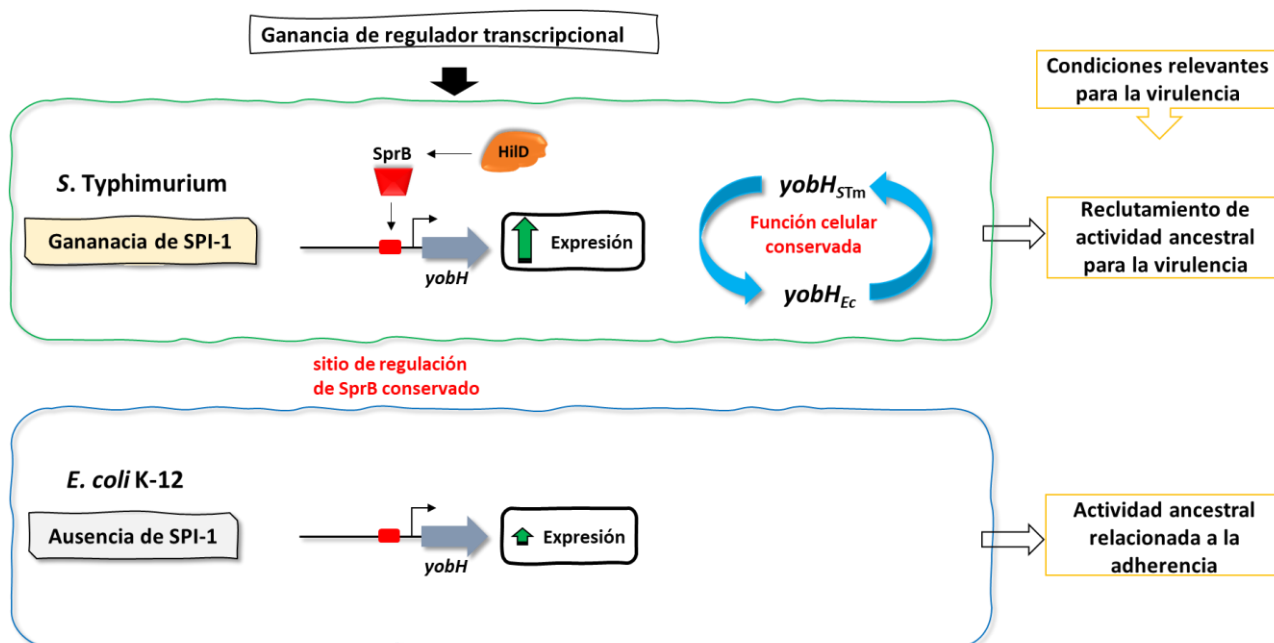


Fig. 23. Reclutamiento de la actividad de YobH para la virulencia de *S. Typhimurium*. Se indica como la actividad de YobH fue reclutada para la virulencia de *S. Typhimurium*, a través de la regulación mediada por el circuito HilD-SprB.

Nuestros resultados muestran que la expresión de $yobH_{STm}$ es mayor a la de $yobH_{Ec}$ en condiciones inductoras de SPI-1. Interesantemente, observamos que el regulador SprB también es capaz de inducir la expresión del gen $yobH_{Ec}$, sin la necesidad de ningún otro regulador específico de *Salmonella*. Además, encontramos una secuencia de siete nucleótidos idénticos cercanos a la región -35 de ambos promotores (de -46 a -40), necesaria para la regulación de $yobH_{STm}$ y $yobH_{Ec}$ por SprB. Estos resultados respaldan la idea de que la adaptación de la regulación de $yobH_{STm}$ por HilD-SprB ocurrió con el reconocimiento, por SprB, de una secuencia reguladora en $yobH_{STm}$, la cual se conserva en $yobH_{Ec}$, y no por cambios *cis*-regulatorios originados durante la divergencia de *Salmonella* y *E. coli* K-12. En un estudio anterior se encontró que SprB se requiere para la expresión de $yobH_{STm}$ incluso

en ausencia de H-NS, por lo que no actúa como factor anti-H-NS (Banda et al., 2019a). Entonces, se necesitan realizar estudios ulteriores para determinar si SprB actúa como un activador transcripcional clásico o como antagonista de un represor diferente a H-NS.

YobH es un factor de virulencia que se requiere para la invasión de *S. Typhimurium* a células hospederas (Banda et al., 2019a). Nosotros mostramos que mutaciones en el sitio de regulación de SprB -46/-40 de *yobH*_{STm} disminuyeron la capacidad de *S. Typhimurium* de adherirse e invadir células HeLa, lo cual indica que la actividad de YobH_{STm} ha sido reclutada para la virulencia de la bacteria, a través de la regulación positiva mediada por el circuito regulatorio HilD-SprB. Diferentes estudios refieren que en *S. Typhimurium* existen otros genes de virulencia, además de *yobH*, que son regulados por el circuito HilD-SprB, como *ugtL* y *slrP* (Banda et al., 2019a; Smith et al., 2016), los cuales están involucrados en la colonización intestinal de *S. Typhimurium* en ratones, pollos, cerdos y vacas (Chaudhuri et al., 2013; Choi and Groisman, 2017; Goto et al., 2017; Tsolis et al., 1999). Nuestros datos también indican que los fenotipos de adhesión e invasión a células HeLa, atenuados en una cepa de *S. Typhimurium* carente de *yobH*, pueden ser restaurados insertando una copia del gen *yobH*_{Ec} en el cromosoma de la mutante. Esto nos sugiere que la función de YobH relacionada a la virulencia de *S. Typhimurium* está conservada entre *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12. A pesar de que nuestros resultados ilustran que *yobH*_{STm} se expresa en el intestino de ratones de manera dependiente de la activación por SprB, no encontramos que YobH esté implicado en la respuesta inflamatoria intestinal, ni en la infección intestinal o sistémica de *S. Typhimurium* en un modelo de colitis en ratón. Sin embargo, los resultados obtenidos en la invasión a células HeLa, y el hecho de que YobH sea secretada (datos no mostrados), sugieren que YobH puede funcionar como un factor de adhesión en *S. Typhimurium*. Esto nos hace pensar que probablemente la simple eliminación de *yobH* no sea suficiente para notar una atenuación de la infección en ratones, teniendo en cuenta que la contribución de las adhesinas puede quedar enmascarada por la presencia de otras adhesinas y los efectos de compensación funcional de estos determinantes (Van Der Velden et al., 1998). Además, *S. enterica*

cuenta con varias adhesinas con funciones altamente específicas que le confieren a la bacteria tropismo por un determinado huésped (Boyen et al., 2006). Ejemplo de esto es la variante de la adhesina fimbrial FimH de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, incapaz de unirse a líneas celulares murinas ni humanas, pero sí a leucocitos de pollo, lo que en parte explica la especificidad de estas serovariantes por huéspedes aviarios (Guo et al., 2009; Kisiela et al., 2006). Por su parte, existen reportes de que la adhesina ShdA participa en la colonización y persistencia de *S. Typhimurium* en el intestino de ratones, pero no en el intestino de cerdos (Boyen et al., 2006; Kingsley et al., 2003). Consistente con esta noción, un análisis previo mediante secuenciación de sitio de inserción dirigida por transposones (TraDIS), mostró que una cepa de *S. Typhimurium* mutante en *yobH* tenía un fenotipo de colonización intestinal disminuido en pollos y vacas, pero no en la infección sistémica en el modelo de ratón (Chaudhuri et al., 2013). Todo esto refuerza la idea de emplear otras líneas celulares y modelos animales, que permitan ampliar nuestros resultados sobre la función de YobH en la patogenicidad de *S. Typhimurium*.

En resumen, nuestro trabajo muestra que la regulación diferencial de genes ortólogos es una fuente importante de variabilidad fenotípica entre bacterias estrechamente relacionadas, que contribuye a la evolución de la virulencia de bacterias patógenas como *S. Typhimurium*. Además, aportamos evidencias de cómo la diferenciación evolutiva de regiones reguladoras puede conducir al rearrreglo de circuitos de regulación transcripcional, que permiten el reclutamiento de actividades ancestrales para la virulencia de las bacterias (Fig. 24).

11. CONCLUSIONES

- La regulación positiva del gen *phoH* de *S. Typhimurium* mediada por HilD, involucró la adquisición de HilD, así como cambios en la región reguladora de *phoH_{STM}* que condujeron a su activación y represión por HilD y H-NS, respectivamente, en condiciones relevantes para la virulencia de la bacteria.
- La adaptación de la regulación del gen *phoH_{STM}* mediada por HilD, permitió una expresión diferencial de *phoH* en condiciones inductoras de SPI-1 entre *S. Typhimurium* y *E. coli*.
- La evolución *cis*-reguladora condujo a la regulación del promotor P1 de *phoH_{STM}* por HilD.
- La evolución *cis*-reguladora condujo a la regulación de *phoH_{STM}* por el represor H-NS, mientras que el gen *phoH_{Ec}* no es regulado por H-NS.
- HilD funciona como un antirepresor de H-NS para inducir la expresión de *phoH_{STM}*.
- La evolución *cis*-reguladora condujo a que *phoH_{STM}* se exprese en condiciones limitantes de Pi, independientemente de PhoR/B, mientras que el gen *phoH_{Ec}* sí es regulado por PhoR/B.
- La actividad ancestral de *phoH_{STM}* ha sido reclutada para intervenir en las etapas tempranas de la colonización intestinal de *S. Typhimurium*, en un modelo de colitis en ratón.
- La regulación positiva de *yobH_{STM}*, mediada por el circuito HilD-SprB, se estableció con la adquisición de los reguladores transcripcionales mediante transferencia horizontal en *Salmonella*, y no por cambios en la región reguladora de *yobH_{STM}* durante la diferenciación evolutiva de *Salmonella* y *E. coli*.
- Los genes *yobH_{STM}* y *yobH_{Ec}* conservan los elementos en *cis* que median la regulación por SprB, pero la expresión de *yobH_{STM}* se favorece en condiciones inductoras de SPI-1, debido a la adquisición de SprB por *Salmonella*.

- La regulación de *yobH* por SprB es requerida para la función de YobH en la adhesión e invasión de *S. Typhimurium* a células HeLa.
- La actividad de YobH_{STm} en la adhesión e invasión de *S. Typhimurium* a células HeLa está conservada en la proteína YobH_{Ec}.
- *yobH*_{STm} se expresa y regula por SprB en el intestino de ratones, pero no se requiere en la infección intestinal ni sistémica de *S. Typhimurium* en un modelo de colitis en ratón.
- El gen *fdnG* de *S. Typhimurium*, pero no el gen *fdnG* de *E. coli* K-12, es regulado por HilD en condiciones inductoras de SPI-1.
- El gen *fdnG*_{STm}, pero no el gen *fdnG*_{Ec}, es reprimido por H-NS en condiciones inductoras de SPI-1.
- La regulación positiva de *fdnG*_{STm} mediada por HilD involucró la adquisición de HilD, así como cambios en la región reguladora de *fdnG*_{STm} que condujeron a su activación y represión por HilD y H-NS, respectivamente, en condiciones relevantes para la virulencia de *Salmonella*.

Rearreglo de circuitos regulatorios en *S. enterica*

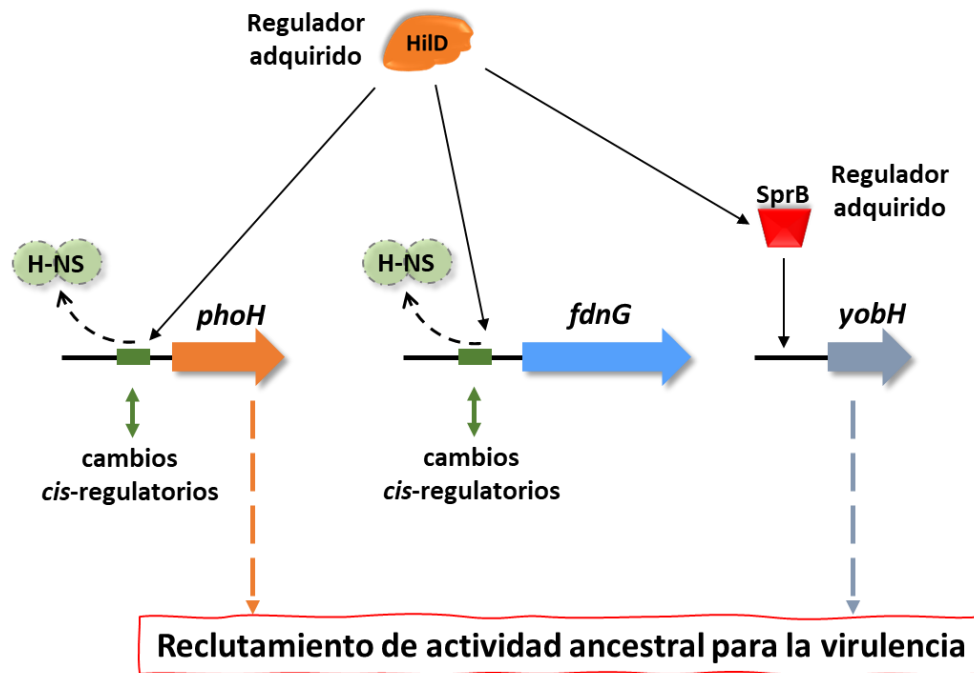


Fig. 24. Rearreglo de circuitos regulatorios de genes ancestrales en *S. enterica* mediados por HiID. La regulación transcripcional de los genes ancestrales *phoH* y *fdnG* mediada por HiD, se adaptó con la adquisición del regulador HiD por *Salmonella* y con la generación de mutaciones en la región reguladora de *phoH* y *fdnG*, que propiciaron la represión por H-NS y la acción de HiD como un antirepresor de H-NS. La adaptación de la regulación transcripcional del gen ancestral *yobH*, mediada por el circuito regulatorio HiD-SprB, se estableció gracias a la adquisición de ambos reguladores por *Salmonella* y al reconocimiento por SprB de secuencias de regulación presentes en la región reguladora de *yobH*. Este rearreglo de circuitos regulatorios ha reclutado las actividades ancestrales de PhoH y YobH para la virulencia de *S. enterica*.

12. PERSPECTIVAS

- Determinar la función fisiológica de *phoH* en *E. coli*.
- Determinar el mecanismo adicional mediante el cual HilD induce la expresión de *phoH*_{STM}.
- Determinar el mecanismo que emplea SprB para regular la expresión de *yobH*.
- Determinar si YobH actúa como un factor de adhesión en otros modelos animales.
- Determinar si la regulación del gen *fdnG* por HilD es importante para la virulencia de *S. Typhimurium* (en cultivos de células o en ratones).
- Determinar las secuencias involucradas en la regulación del gen *fdnG* de *S. Typhimurium* por HilD y H-NS.

13. CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abby, S.S., Rocha, E.P.C., 2012. The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems. *PLoS Genet.* 8, e1002983. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002983>
- Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., S Gupta, R., 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the “*Enterobacteriales*”: proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morgane*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 5575–5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
- Ali, S.S., Soo, J., Rao, C., Leung, A.S., Ngai, D.H.M., Ensminger, A.W., Navarre, W.W., 2014. Silencing by H-NS Potentiated the Evolution of *Salmonella*. *PLoS Pathog.* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004500>
- Altier, C., 2005. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J. Microbiol.* 43, 85–92.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H., 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Banda, M.M., López, C., Manzo, R., Rico-Pérez, G., García, P., Rosales-Reyes, R., De la Cruz, M.A., Soncini, F.C., García-del Portillo, F., Bustamante, V.H., 2018. HilD and PhoP independently regulate the expression of *grhDI*, a novel gene required for *Salmonella* Typhimurium invasion of host cells. *Sci. Rep.* 8, 4841. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23068-0>
- Banda, M.M., Manzo, R., Bustamante, V.H., 2019a. HilD induces expression of a novel *Salmonella* Typhimurium invasion factor, YobH, through a regulatory cascade involving SprB. *Sci. Rep.* 9, 12725. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49192-z>
- Banda, M.M., Zavala-Alvarado, C., Pérez-Morales, D., Bustamante, V.H., 2019b. SlyA and HilD Counteract H-NS-Mediated Repression on the *ssrAB* Virulence Operon of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Thus Promote Its Activation by OmpR. *J. Bacteriol.* 201, 1–14. <https://doi.org/10.1128/JB.00530-18>
- Barthel, M., Hapfelmeier, S., Quintanilla-Martínez, L., Kremer, M., Rohde, M., Hogardt, M., Pfeffer,

- K., Rüssmann, H., Hardt, W.-D., 2003. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect. Immun.* 71, 2839–58. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2839-2858.2003>
- Berg, B.L., Stewart, V., 1990. Structural genes for nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 125, 691–702. <https://doi.org/10.1093/genetics/125.4.691>
- Boddicker, J.D., Knosp, B.M., Jones, B.D., 2003. Transcription of the *Salmonella* invasion gene activator, *hilA*, requires HilD activation in the absence of negative regulators. *J. Bacteriol.* 185, 525–533. <https://doi.org/10.1128/JB.185.2.525-533.2003>
- Boyen, F., Pasmans, F., Donné, E., Van Immerseel, F., Morgan, E., Adriaensen, C., Hernalsteens, J.-P., Wallis, T.S., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 2006. The fibronectin binding protein ShdA is not a prerequisite for long term faecal shedding of *Salmonella typhimurium* in pigs. *Vet. Microbiol.* 115, 284–90. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.02.006>
- Brady, C.L., Cleenwerck, I., Venter, S.N., Engelbeen, K., De Vos, P., Coutinho, T.A., 2010. Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical samples, *Pantoea septica* sp. nov., *Pantoea eucrina* sp. nov., *Pantoea brenneri* sp. nov. and *Pantoea conspicua* sp. nov., and transfer of *Pectobacterium cypripedii* (Hor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2430–2440. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.017301-0>
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., Swaminathan, B., 2000. *Salmonella* Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2465–2467. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2465-2467.2000>
- Brosius, J., 1984. Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene* 27, 151–160. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(84\)90136-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(84)90136-7)
- Bustamante, V.H., Martínez, L.C., Santana, F.J., Knodler, L.A., Steele-Mortimer, O., Puente, J.L., 2008. HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14591–14596. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801205105>
- Bustamante, V.H., Villalba, M.I., García-Angulo, V.A., Vázquez, A., Martínez, L.C., Jiménez, R., Puente, J.L., 2011. PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 82, 398–415. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07819.x>
- Cakar, F., Golubeva, Y.A., Vanderpool, C.K., Slauch, J.M., 2022. The Small RNA MicC

Downregulates *hilD* Translation To Control the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 204. <https://doi.org/10.1128/JB.00378-21>

Chaudhuri, R.R., Morgan, E., Peters, S.E., Pleasance, S.J., Hudson, D.L., Davies, H.M., Wang, J., van Diemen, P.M., Buckley, A.M., Bowen, A.J., Pullinger, G.D., Turner, D.J., Langridge, G.C., Turner, A.K., Parkhill, J., Charles, I.G., Maskell, D.J., Stevens, M.P., 2013. Comprehensive Assignment of Roles for *Salmonella* Typhimurium Genes in Intestinal Colonization of Food-Producing Animals. *PLoS Genet.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003456>

Choi, J., Groisman, E.A., 2020. Horizontally acquired regulatory gene activates ancestral regulatory system to promote *Salmonella* virulence. *Nucleic Acids Res.* 48, 10832–10847. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa813>

Choi, J., Groisman, E.A., 2017. Activation of master virulence regulator PhoP in acidic pH requires the *Salmonella*-specific protein UgtL. *Sci. Signal.* 10. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aan6284>

Choi, K.H., Gaynor, J.B., White, K.G., Lopez, C., Bosio, C.M., Karkhoff-Schweizer, R.A.R., Schweizer, H.P., 2005. A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat. Methods* 2, 443–448. <https://doi.org/10.1038/nmeth765>

Coburn, B., Grassl, G.A., Finlay, B.B., 2007. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol. Cell Biol.* 85, 112–118. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100007>

Colgan, A.M., Kröger, C., Diard, M., Hardt, W.D., Puente, J.L., Sivasankaran, S.K., Hokamp, K., Hinton, J.C.D., 2016. The Impact of 18 Ancestral and Horizontally-Acquired Regulatory Proteins upon the Transcriptome and sRNA Landscape of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS Genet.* 12, 1–42. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006258>

Costa, T.R.D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M.S., Redzej, A., Trokter, M., Waksman, G., 2015. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 343–59. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3456>

Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>

de Jong, H.K., Parry, C.M., van der Poll, T., Wiersinga, W.J., 2012. Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLoS Pathog.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002933>

- Deng, W., Marshall, N.C., Rowland, J.L., McCoy, J.M., Worrall, L.J., Santos, A.S., Strynadka, N.C.J., Finlay, B.B., 2017. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 323–337. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.20>
- Desai, P.T., Porwollik, S., Long, F., Cheng, P., Wollam, A., Clifton, S.W., Weinstock, G.M., McClelland, M., 2013. Evolutionary genomics of *Salmonella enterica* subspecies. *MBio* 4, 1–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00579-12>
- dos Santos, A.M.P., Ferrari, R.G., Conte-Junior, C.A., 2019. Virulence Factors in *Salmonella* Typhimurium: The Sagacity of a Bacterium. *Curr. Microbiol.* 76, 762–773. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1510-4>
- Eichelberg, K., Hardt, W.D., Galán, J.E., 1999. Characterization of SprA, an AraC-like transcriptional regulator encoded within the *Salmonella* typhimurium pathogenicity island 1. *Mol. Microbiol.* 33, 139–152. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1999.01458.X>
- Ellermeier, C.D., Ellermeier, J.R., Slauch, J.M., 2005. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hila* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* 57, 691–705. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04737.x>
- Eng, S.K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.S., Ser, H.L., Chan, K.G., Lee, L.H., 2015. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front. Life Sci.* 8, 284–293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- Fàbrega, A., Vila, J., 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 308–341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>
- Fang, F.C., Rimsky, S., 2008. New insights into transcriptional regulation by H-NS. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 113–120. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2008.02.011>
- Ferenci, T., Zhou, Z., Betteridge, T., Ren, Y., Liu, Y., Feng, L., Reeves, P.R., Wang, L., 2009. Genomic sequencing reveals regulatory mutations and recombinational events in the widely used MC4100 lineage of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.00118-09>
- Finlay, B.B., Ruschkowski, S., Dedhar, S., 1991. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. *J. Cell Sci.* 99, 283–296.

<https://doi.org/10.1242/jcs.99.2.283>

Foley, S.L., Lynne, A.M., Nayak, R., 2008. *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *J. Anim. Sci.* 86. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0464>

Foster, J.W., Hall, H.K., 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 173, 5129–5135. <https://doi.org/10.1128/JB.173.16.5129-5135.1991>

Francis, C.L., Ryan, T.A., Jones, B.D., Smith, S.J., Falkow, S., 1993. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* 364, 639–642. <https://doi.org/10.1038/364639a0>

Gal-Mor, O., Finlay, B.B., 2006. Pathogenicity islands: A molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell. Microbiol.* 8, 1707–1719. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00794.x>

Gerlach, R.G., Jäckel, D., Stecher, B., Wagner, C., Lupas, A., Hardt, W.D., Hensel, M., 2007. *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell. Microbiol.* 9, 1834–1850. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00919.x>

Giammanco, G.M., Pignato, S., Mammina, C., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Nastasi, A., Giammanco, G., 2002. Persistent Endemicity of *Salmonella bongori* 48:z 35 :– in Southern Italy: Molecular Characterization of Human, Animal, and Environmental Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3502–3505. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3502-3505.2002>

Golubeva, Y.A., Ellermeier, J.R., Chubiz, J.E.C., Slauch, J.M., 2016. Intestinal Long-Chain Fatty Acids Act as a Direct Signal To Modulate Expression of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System. *MBio* 7. <https://doi.org/10.1128/MBIO.02170-15>

Golubeva, Y.A., Sadik, A.Y., Ellermeier, J.R., Slauch, J.M., 2012. Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity Island 1 type III secretion system. *Genetics* 190, 79–90. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.132779>

Gordon, M.A., Banda, H.T., Gondwe, M., Gordon, S.B., Boeree, M.J., Walsh, A.L., Corkill, J.E., Hart, C.A., Gilks, C.F., Molyneux, M.E., 2002. Non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia among HIV-infected Malawian adults: High mortality and frequent recrudescence. *Aids* 16, 1633–1641. <https://doi.org/10.1097/00002030-200208160-00009>

- Goto, R., Miki, T., Nakamura, N., Fujimoto, M., Okada, N., 2017. *Salmonella* Typhimurium PagP- and UgtL-dependent resistance to antimicrobial peptides contributes to the gut colonization. PLoS One 12, e0190095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190095>
- Grenz, J.R., Chubiz, J.E.C., Thaprawat, P., Slauch, J.M., 2018. HilE regulates HilD by blocking DNA binding in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Bacteriol. 200. <https://doi.org/10.1128/JB.00750-17>
- Guo, A., Cao, S., Tu, L., Chen, P., Zhang, C., Jia, A., Yang, W., Liu, Z., Chen, H., Schifferli, D.M., 2009. FimH alleles direct preferential binding of *Salmonella* to distinct mammalian cells or to avian cells. Microbiology 155, 1623–1633. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026286-0>
- Hansmeier, N., Miskiewicz, K., Elpers, L., Liss, V., Hensel, M., Sterzenbach, T., 2017. Functional expression of the entire adhesiome of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. Sci. Rep. 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10598-2>
- Haraga, A., Ohlson, M.B., Miller, S.I., 2008. *Salmonellae* interplay with host cells. Nat. Rev. Microbiol. 6, 53–66. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1788>
- Hensel, M., 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. Int. J. Med. Microbiol. 294, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.025>
- Hoiseth, S.K., Stocker, B.A., 1981. Aromatic-dependent *Salmonella* typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. Nature 291, 238–9. <https://doi.org/10.1038/291238a0>
- Horton, R.A., Wu, G., Speed, K., Kidd, S., Davies, R., Coldham, N.G., Duff, J.P., 2013. Wild birds carry similar *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to those found in domestic animals and livestock. Res. Vet. Sci. 95, 45–48. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.02.008>
- Hume, P.J., Singh, V., Davidson, A.C., Koronakis, V., 2017. Swiss army pathogen: The *Salmonella* entry toolkit. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00348>
- Husseiny, M.I., Hensel, M., 2005. Rapid Method for the Construction of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Vaccine Carrier Strains. Infect. Immun. 73, 1598. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1598-1605.2005>
- Ibarra, J.A., Knodler, L.A., Sturdevant, D.E., Virtaneva, K., Carmody, A.B., Fischer, E.R., Porcella, S.F., Steele-Mortimer, O., 2010. Induction of *Salmonella* pathogenicity island 1 under different growth conditions can affect *Salmonella*-host cell interactions in vitro. Microbiology 156, 1120–1133. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032896-0>

- Ilyas, B., Mulder, D.T., Little, D.J., Elhenawy, W., Banda, M.M., Pérez-Morales, D., Tsai, C.N., Chau, N.Y.E., Bustamante, V.H., Coombes, B.K., 2018. Regulatory Evolution Drives Evasion of Host Inflammasomes by *Salmonella* Typhimurium. *Cell Rep.* 25, 825-832.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.078>
- Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., De Pinna, E., Nair, S., Fields, P.I., Weill, F.X., 2014. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.* 165, 526–530. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004>
- Jajere, S.M., 2019. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet. World* 12, 504–521. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>
- Jiang, J., Yu, K., Qi, L., Liu, Y., Cheng, S., Wu, M., Wang, Z., Fu, J., Liu, X., 2018. A proteomic view of *Salmonella* Typhimurium in response to phosphate limitation. *Proteomes* 6.
<https://doi.org/10.3390/PROTEOMES6020019>
- Jones, B.D., 2005. Salmonella invasion gene regulation: A story of environmental awareness. *J. Microbiol.* 43, 110–117.
- Kazakov, A.E., Vassieva, O., Gelfand, M.S., Osterman, A., Overbeek, R., 2003. Bioinformatics classification and functional analysis of PhoH homologs. *In Silico Biol.* 3, 3–15.
- Kim, K., Palmer, A.D., Vanderpool, C.K., Slauch, J.M., 2019. The small RNA pint contributes to phop-mediated regulation of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* 201, 1–14.
<https://doi.org/10.1128/JB.00312-19>
- Kim, S.K., Makino, K., Amemura, M., Shinagawa, H., Nakata, A., 1993. Molecular analysis of the *phoH* gene, belonging to the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175, 1316–1324. <https://doi.org/10.1128/jb.175.5.1316-1324.1993>
- Kingsley, R.A., Humphries, A.D., Weening, E.H., De Zoete, M.R., Winter, S., Papaconstantinopoulou, A., Dougan, G., Bäumlner, A.J., 2003. Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect. Immun.* 71, 629–40.
<https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.629-640.2003>
- Kisiela, D., Laskowska, A., Sapeta, A., Kuczkowski, M., Wieliczko, A., Ugorski, M., 2006.

Functional characterization of the FimH adhesin from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Microbiology* 152, 1337–1346. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28588-0>

Klein, J.A., Grenz, J.R., Slauch, J.M., Knodler, L.A., 2017. Controlled Activity of the *Salmonella* Invasion-Associated Injectisome Reveals Its Intracellular Role in the Cytosolic Population. *MBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.01931-17>

Kline, K.A., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S., Henriques-Normark, B., 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 5, 580–592. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2009.05.011>

Kröger, C., Colgan, A., Srikumar, S., Händler, K., Sivasankaran, S.K., Hammarlöf, D.L., Canals, R., Grissom, J.E., Conway, T., Hokamp, K., Hinton, J.C.D., 2013. An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Cell Host Microbe* 14, 683–95. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.11.010>

Lane, M.C., Alteri, C.J., Smith, S.N., Mobley, H.L.T., 2007. Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16669–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607898104>

Laughlin, R.C., Knodler, L.A., Barhoumi, R., Ross Payne, H., Wu, J., Gomez, G., Pugh, R., Lawhon, S.D., Bäumler, A.J., Steele-Mortimer, O., Garry Adamsa, L., 2014. Spatial Segregation of Virulence Gene Expression during Acute Enteric Infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *MBio* 5. <https://doi.org/10.1128/MBIO.00946-13>

Lawhon, S.D., Maurer, R., Suyemoto, M., Altier, C., 2002. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol. Microbiol.* 46, 1451–64. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03268.x>

Lopez, C.A., Rivera-Chávez, F., Byndloss, M.X., Bäumler, A.J., 2015. The periplasmic nitrate reductase NapABC supports luminal growth of *Salmonella enterica* serovar typhimurium during colitis. *Infect. Immun.* 83, 3470–3478. <https://doi.org/10.1128/IAI.00351-15>

Lopez, C.A., Winter, S.E., Rivera-Chávez, F., Xavier, M.N., Poon, V., Nuccio, S.P., Tsolis, R.M., Bäumler, A.J., 2012. Phage-mediated acquisition of a type III secreted effector protein boosts growth of *Salmonella* by nitrate respiration. *MBio* 3, 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00143-12>

Lou, L., Zhang, P., Piao, R., Wang, Y., 2019. *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its

Complex Regulatory Network. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 1–12.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00270>

Lucas, R.L., Lostroh, C.P., DiRusso, C.C., Spector, M.P., Wanner, B.L., Lee, C.A., 2000. Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* 182, 1872–1882. <https://doi.org/10.1128/JB.182.7.1872-1882.2000>

Lundberg, U., Vinatzer, U., Berdnik, D., Von Gabain, A., Baccarini, M., 1999. Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J. Bacteriol.* 181, 3433–3437.

<https://doi.org/10.1128/JB.181.11.3433-3437.1999>

Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A., Hoekstra, R.M., 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis.* 50, 882–889. <https://doi.org/10.1086/650733>

Martínez-Flores, I., Pérez-Morales, D., Sánchez-Pérez, M., Paredes, C.C., Collado-Vides, J., Salgado, H., Bustamante, V.H., 2016. *In silico* clustering of *Salmonella* global gene expression data reveals novel genes co-regulated with the SPI-1 virulence genes through HilD. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep37858>

Martinez-Guerrero, C.E., Ciria, R., Abreu-Goodger, C., Moreno-Hagelsieb, G., Merino, E., 2008. GeConT 2: gene context analysis for orthologous proteins, conserved domains and metabolic pathways. *Nucleic Acids Res.* 36, W176-80. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn330>

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*. *J. Bacteriol.* 196, 3746–3755.

<https://doi.org/10.1128/JB.01799-14>

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. *Mol. Microbiol.* 80, 1637–1656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07674.x>

Mayer, C.A., Neilson, A.A., 2010. Typhoid and paratyphoid fever-prevention in travellers. *Aust. Fam. Physician* 39, 847–51. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67652-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67652-0)

- Mayer, M.P., 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* 163, 41–46. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00389-N](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00389-N)
- Morgan, E., Campbell, J.D., Rowe, S.C., Bispham, J., Stevens, M.P., Bowen, A.J., Barrow, P.A., Maskell, D.J., Wallis, T.S., 2004. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* 54, 994–1010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04323.x>
- Nastasi, A., Mammina, C., Villafrate, M.R., Massenti, M.F., Scarlata, G., Diquattro, M., 1988. Multiple typing of strains of *Salmonella enterica* subsp. bongori ser. 48:Z35:- isolated in southern Italy. *Ann. Inst. Pasteur. Microbiol.* 139, 605–12. [https://doi.org/10.1016/0769-2609\(88\)90158-5](https://doi.org/10.1016/0769-2609(88)90158-5)
- Navarre, W.W., Porwollik, S., Wang, Y., McClelland, M., Rosen, H., Libby, S.J., Fang, F.C., 2006. Selective Silencing of Foreign DNA with Low GC Content by the H-NS Protein in *Salmonella*. *Science* (80-.). 313, 236–238. <https://doi.org/10.1126/science.1128794>
- Nieto, P.A., Pardo-Roa, C., Salazar-Echegarai, F.J., Tobar, H.E., Coronado-Arrázola, I., Riedel, C.A., Kalergis, A.M., Bueno, S.M., 2016. New insights about excisable pathogenicity islands in *Salmonella* and their contribution to virulence. *Microbes Infect.* 18, 302–309. <https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2016.02.001>
- Olekhovich, I.N., Kadner, R.J., 2007. Role of nucleoid-associated proteins Hha and H-NS in expression of *Salmonella enterica* activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion. *J. Bacteriol.* 189, 6882–6890. <https://doi.org/10.1128/JB.00905-07>
- Olekhovich, I.N., Kadner, R.J., 2006. Crucial Roles of Both Flanking Sequences in Silencing of the *hilA* promoter in *Salmonella enterica*. *J. Mol. Biol.* 357, 373–386. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2006.01.007>
- Osborne, S.E., Walthers, D., Tomljenovic, A.M., Mulder, D.T., Silphaduang, U., Duong, N., Lowden, M.J., Wickham, M.E., Waller, R.F., Kenney, L.J., Coombes, B.K., 2009. Pathogenic adaptation of intracellular bacteria by rewiring a *cis*-regulatory input function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 3982–3987. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811669106>
- Palmer, A.D., Kim, K., Slauch, J.M., 2019. PhoP-Mediated Repression of the SPI1 Type 3 Secretion System in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 201, 1–15. <https://doi.org/10.1128/JB.00264-19>

- Paredes-Amaya, C.C., Valdés-García, G., Juárez-González, V.R., Rudiño-Piñera, E., Bustamante, V.H., 2018. The Hcp-like protein HilE inhibits homodimerization and DNA binding of the virulence-associated transcriptional regulator HilD in *Salmonella*. *J. Biol. Chem.* 293, 6578–6592. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001421>
- Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T.G., Prentice, M.B., Sebaihia, M., James, K.D., Churcher, C., Mungall, K.L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S.D., Brooks, K., Cerdeño-Tárraga, A.M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R.M., Davis, P., Dougan, G., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A. V., Leather, S., Moule, S., Oyston, P.C.F., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* 413, 523–7. <https://doi.org/10.1038/35097083>
- Pérez-Morales, D., Banda, M.M., Chau, N.Y.E., Salgado, H., Martínez-Flores, I., Ibarra, J.A., Ilyas, B., Coombes, B.K., Bustamante, V.H., 2017. The transcriptional regulator SsrB is involved in a molecular switch controlling virulence lifestyles of *Salmonella*. *PLoS Pathog.* 13, 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006497>
- Perez, J.C., Groisman, E.A., 2009. Evolution of Transcriptional Regulatory Circuits in Bacteria. *Cell* 138, 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.002>
- Petrone, B.L., Stringer, A.M., Wade, J.T., 2014. Identification of HilD-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 196, 1094–101. <https://doi.org/10.1128/JB.01449-13>
- Portaliou, A.G., Tsolis, K.C., Loos, M.S., Zorzini, V., Economou, A., 2016. Type III Secretion: Building and Operating a Remarkable Nanomachine. *Trends Biochem. Sci.* 41, 175–189. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2015.09.005>
- Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R.P., Tükel, C., Akçelik, M., Bäumlér, A.J., 2006. Capsule-Mediated Immune Evasion: a New Hypothesis Explaining Aspects of Typhoid Fever Pathogenesis. *Infect. Immun.* 74, 19–27. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.19-27.2006>
- Ramachandran, V.K., Shearer, N., Thompson, A., 2014. The primary transcriptome of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and its dependence on ppGpp during late stationary phase. *PLoS One* 9, e92690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092690>
- Rivera-Chávez, F., Lopez, C.A., Zhang, L.F., García-Pastor, L., Chávez-Arroyo, A., Lokken, K.L.,

- Tsolis, R.M., Winter, S.E., Bäumlér, A.J., 2016. Energy taxis toward host-derived nitrate supports a *Salmonella* pathogenicity island 1-independent mechanism of invasion. *MBio* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00960-16>
- Rivera-Chávez, F., Winter, S.E., Lopez, C.A., Xavier, M.N., Winter, M.G., Nuccio, S.P., Russell, J.M., Laughlin, R.C., Lawhon, S.D., Sterzenbach, T., Bevins, C.L., Tsolis, R.M., Harshey, R., Adams, L.G., Bäumlér, A.J., 2013. *Salmonella* Uses Energy Taxis to Benefit from Intestinal Inflammation. *PLoS Pathog.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003267>
- Romero-González, L.E., Pérez-Morales, D., Cortés-Avalos, D., Vázquez-Guerrero, E., Paredes-Hernández, D.A., Estrada-De los Santos, P., Villa-Tanaca, L., de la Cruz, M.A., Bustamante, V.H., Antonio Ibarra, J., 2020. The *Salmonella* Typhimurium InvF-SicA complex is necessary for the transcription of *sopB* in the absence of the repressor H-NS. *PLoS One* 15, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240617>
- Saini, S., Rao, C. V., 2010. SprB Is the molecular link between *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4. *J. Bacteriol.* 192, 2459–2462. <https://doi.org/10.1128/JB.00047-10>
- Saini, S., Slauch, J.M., Aldridge, P.D., Rao, C. V., 2010. Role of cross talk in regulating the dynamic expression of the flagellar *Salmonella* pathogenicity island 1 and type 1 fimbrial genes. *J. Bacteriol.* 192, 5767–5777. <https://doi.org/10.1128/JB.00624-10>
- Sana, T.G., Flaughnatti, N., Lugo, K.A., Lam, L.H., Jacobson, A., Baylot, V., Durand, E., Journet, L., Cascales, E., Monack, D.M., 2016. *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E5044–E5051. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608858113>
- Santos-Beneit, F., 2015. The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Front. Microbiol.* 6, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00402>
- Santos, R.L., Bäumlér, A.J., 2004. Cell tropism of *Salmonella enterica*. *Int. J. Med. Microbiol.* 294, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.029>
- Santos, R.L., Zhang, S., Tsolis, R.M., Kingsley, R.A., Garry Adams, L., Bäumlér, A.J., 2001. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect.* 3, 1335–1344. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01495-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01495-2)
- Schechter, L.M., Lee, C.A., 2001. AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella* typhimurium *hilA* promoter. *Mol. Microbiol.* 40, 1289–99.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02462.x>

- 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*. *J. Bacteriol.* 196, 1448–1457. <https://doi.org/10.1128/JB.01438-13>
- Smith, C., Stringer, A.M., Mao, C., Palumbo, M.J., Wade, J.T., 2016. Mapping the Regulatory Network for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Invasion. *MBio* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01024-16>
- Soto, G.E., Hultgren, S.J., 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* 181, 1059–71. <https://doi.org/10.1128/JB.181.4.1059-1071.1999>
- Stecher, B., Robbiani, R., Walker, A.W., Westendorf, A.M., Barthel, M., Kremer, M., Chaffron, S., Macpherson, A.J., Buer, J., Parkhill, J., Dougan, G., Von Mering, C., Hardt, W.D., 2007. *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 5, 2177–2189. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050244>
- Tahoun, A., Mahajan, S., Paxton, E., Malterer, G., Donaldson, D.S., Wang, D., Tan, A., Gillespie, T.L., O’Shea, M., Roe, A.J., Shaw, D.J., Gally, D.L., Lengeling, A., Mabbott, N.A., Haas, J., Mahajan, A., 2012. *Salmonella* Transforms Follicle-Associated Epithelial Cells into M Cells to Promote Intestinal Invasion. *Cell Host Microbe* 12, 645–656. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2012.10.009>
- Takaya, A., Kubota, Y., Isogai, E., Yamamoto, T., 2005. Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads to downregulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Mol. Microbiol.* 55, 839–852. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2004.04425.X>
- Tauxe, R. V., 1991. *Salmonella* : A Postmodern Pathogen. *J. Food Prot.* 54, 563–568. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.7.563>
- Teixidó, L., Carrasco, B., Alonso, J.C., Barbé, J., Campoy, S., 2011. Fur Activates the Expression of *Salmonella enterica* Pathogenicity Island 1 by Directly Interacting with the *hilD* Operator *In Vivo* and *In Vitro*. *PLoS One* 6, 19711. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0019711>
- Thijs, I.M.V., De Keersmaecker, S.C.J., Fadda, A., Engelen, K., Zhao, H., McClelland, M., Marchal, K., Vanderleyden, J., 2007. Delineation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulon through genome-wide location and transcript analysis. *J. Bacteriol.* 189, 4587–4596.

<https://doi.org/10.1128/JB.00178-07>

- Tsolis, R.M., Townsend, S.M., Miao, E.A., Miller, S.I., Ficht, T.A., Adams, L.G., Bäumlér, A.J., 1999. Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype typhimurium host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.* 67, 6385–93. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.12.6385-6393.1999>
- Ueguchi, C., Suzuki, T., Yoshida, T., Tanaka, K.I., Mizuno, T., 1996. Systematic Mutational Analysis Revealing the Functional Domain Organization of *Escherichia coli* Nucleoid Protein H-NS. *J. Mol. Biol.* 263, 149–162. <https://doi.org/10.1006/JMBI.1996.0566>
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., Bossi, L., 2001. Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 15264–15269. <https://doi.org/10.1073/pnas.261348198>
- Valdespino-Díaz, M.A., 2018. Regulación de la expresión y papel en virulencia de los genes *phoH* y *SL1896* de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.
- Valdespino-Díaz, M.A., Rosales-Reyes, R., De la Cruz, M.A., Bustamante, V.H., Cruz, M.A.D. la, Bustamante, V.H., De la Cruz, M.A., Bustamante, V.H., 2022. Regulatory Evolution of the *phoH* Ancestral Gene in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* e0058521. <https://doi.org/10.1128/jb.00585-21>
- Van Der Velden, A.W.M., Bäumlér, A.J., Tsolis, R.M., Heffron, F., 1998. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella* typhimurium in mice. *Infect. Immun.* 66, 2803–2808. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.6.2803-2808.1998>
- Wagner, C., Hensel, M., 2011. Adhesive Mechanisms of *Salmonella enterica*, in: Linke, D., Goldman, A. (Eds.), *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Dordrecht, pp. 17–34. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9_2
- Wang, H., Gunsalus, R.P., 2003. Coordinate regulation of the *Escherichia coli* formate dehydrogenase *fdnGHI* and *fdhF* genes in response to nitrate, nitrite, and formate: Roles for NarL and NarP. *J. Bacteriol.* 185, 5076–5085. <https://doi.org/10.1128/JB.185.17.5076-5085.2003>
- Wang, R.F., Kushner, S.R., 1991. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* 100, 195–9.

[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90366-J](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90366-J)

- Winfield, M.D., Groisman, E.A., 2004. Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 17162–17167. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406038101>
- Yang, C., Huang, T.W., Wen, S.Y., Chang, C.Y., Tsai, S.F., Wu, W.F., Chang, C.H., 2012. Genome-Wide PhoB Binding and Gene Expression Profiles Reveal the Hierarchical Gene Regulatory Network of Phosphate Starvation in *Escherichia coli*. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047314>
- Zhang, S., Kingsley, R.A., Santos, R.L., Andrews-Polymenis, H., Raffatellu, M., Figueiredo, J., Nunes, J., Tsolis, R.M., Adams, L.G., Bäumlér, A.J., S, Z., RA, K., RL, S., H, A.-P., M, R., J, F., J, N., RM, T., LG, A., AJ, B., 2003. Molecular Pathogenesis of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium-Induced Diarrhea. *Infect. Immun.* 71, 1–12. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.1-12.2003>
- Zierler, M.K., Galan, J.E., 1995. Contact with cultured epithelial cells stimulates secretion of *Salmonella typhimurium* invasion protein InvJ. *Infect. Immun.* 63, 4024–4028. <https://doi.org/10.1128/iai.63.10.4024-4028.1995>

14. ANEXO

Artículo Publicado del Proyecto de Doctorado



Regulatory Evolution of the *phoH* Ancestral Gene in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

Marcos A. Valdespino-Díaz,^a Roberto Rosales-Reyes,^b Miguel A. De la Cruz,^c Víctor H. Bustamante^a

^aDepartamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

^bUnidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

^cUnidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, México

ABSTRACT One important event for the divergence of *Salmonella* from *Escherichia coli* was the acquisition by horizontal transfer of the *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1), containing genes required for the invasion of host cells by *Salmonella*. HilD is an AraC-like transcriptional regulator in SPI-1 that induces the expression of the SPI-1 and many other acquired virulence genes located in other genomic regions of *Salmonella*. Additionally, HilD has been shown to positively control the expression of some ancestral genes (also present in *E. coli* and other bacteria), including *phoH*. In this study, we determined that both the gain of HilD and *cis*-regulatory evolution led to the integration of the *phoH* gene into the HilD regulon. Our results indicate that a HilD-binding sequence was generated in the regulatory region of the *S. enterica* serovar Typhimurium *phoH* gene, which mediates the activation of promoter 1 of this gene under SPI-1-including conditions. Furthermore, we found that repression by H-NS, a histone-like protein, was also adapted on the *S. Typhimurium phoH* gene and that HilD activates the expression of this gene in part by antagonizing H-NS. Additionally, our results revealed that the expression of the *S. Typhimurium phoH* gene is also activated in response to low phosphate but independently of the PhoB/R two-component system, known to regulate the *E. coli phoH* gene in response to low phosphate. Thus, our results indicate that *cis*-regulatory evolution has played a role in the expansion of the HilD regulon and illustrate the phenomenon of differential regulation of ortholog genes.

IMPORTANCE Two mechanisms mediating differentiation of bacteria are well known: acquisition of genes by horizontal transfer events and mutations in coding DNA sequences. In this study, we found that the *phoH* ancestral gene is differentially regulated between *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli*, two closely related bacterial species. Our results indicate that this differential regulation was generated by mutations in the regulatory sequence of the *S. Typhimurium phoH* gene and by the acquisition by *S. Typhimurium* of foreign DNA encoding the transcriptional regulator HilD. Thus, our results, together with those from an increasing number of studies, indicate that *cis*-regulatory evolution can lead to the rewiring and reprogramming of transcriptional regulation, which also plays an important role in the divergence of bacteria through time.

KEYWORDS AraC-like, *cis*-regulatory, *Escherichia coli*, H-NS, HilD, PhoB/R, regulatory evolution, SPI-1, *Salmonella*, *phoH*

The acquisition of foreign DNA through horizontal transfer events is one of the main genetic processes that influences the dynamics of bacterial genomes (1). Likewise, the adaptation of regulatory mechanisms to control the expression of acquired genes, or even to modify the expression pattern of ancestral genes, has been pivotal for evolution of bacteria, including pathogenic species (2–5). During its divergence from *Escherichia coli*, about 100 million years ago, the Gram-negative pathogen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Editor George O'Toole, Geisel School of Medicine at Dartmouth

Copyright © 2022 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Víctor H. Bustamante, vic tor.bustamante@ibci.unam.mx.

The authors declare no conflict of interest.

Received 18 November 2021

Accepted 25 March 2022

Published 11 April 2022

(*S. Typhimurium*) shaped approximately a quarter of its genome with acquired DNA (6). Most of the genes for *S. Typhimurium* virulence have been acquired by horizontal transfer events and are located in discrete regions of the genome called *Salmonella* pathogenicity islands (SPI), which are not present in *E. coli* (3, 6). SPI-1, a cluster of 39 genes, is essential for the *S. Typhimurium* invasion of intestinal epithelium cells, which leads to enteritis (7, 8).

HilD is a member of the AraC/XylS family of transcriptional regulators, located in SPI-1, which directly or through distinct regulators positively controls the expression of the SPI-1 genes and several other related genes located outside this island (2, 3, 9–13). Interestingly, HilD has been shown to induce not only the expression of numerous acquired genes but also that of some ancestral genes (those present in *E. coli* and other phylogenetically distant bacteria). For instance, HilD positively regulates the expression of the *flhDC* ancestral operon, which encodes the master complex regulator of flagellar and chemotaxis genes, FlhD₂C₂ (14, 15). Furthermore, HilD induces the expression of the *yobH* ancestral gene that codes for the 79-amino-acid polypeptide YobH (11, 12, 16). Importantly, both the flagellar/chemotaxis genes and the *yobH* gene are necessary for the *Salmonella* invasion of host cells (16–20). Therefore, HilD has played a major role in the evolution of *Salmonella* pathogenicity by integrating the expression of tens of acquired genes and some ancestral genes into a big virulence regulon.

Previously, we and others found that HilD also induces the expression of the *phoH* ancestral gene under SPI-1-inducing conditions, such as the growth of bacteria in nutrient-rich lysogeny broth (LB) (10–12). Orthologs of the PhoH protein are present in *E. coli* and many other bacteria as well as in some archaea; however, the function of PhoH remains unknown in all microorganisms (21, 22). In *E. coli*, it has been demonstrated that the expression of *phoH* is induced by the PhoB/R two-component system in minimal medium containing a low concentration of phosphate; additionally, it was found that PhoH shows ATPase activity (23). The PhoB/R system positively regulates the expression of several other genes in response to low phosphate, including the *pstS* gene; the response regulator PhoB binds to a sequence denominated *pho*-box that is present on the regulatory regions of its target genes (24).

Remarkably, to our knowledge, in addition to the PhoB/R system (or orthologs), HilD is the only other regulator that has been involved in the expression of *phoH*. Hence, in this study we aimed to uncover the elements that led to the integration of the *phoH* gene into the HilD regulon.

By comparing the expression of the *phoH* gene from *S. Typhimurium* and *E. coli*, we show that the gain of HilD and *as*-regulatory evolution led to the regulation of *phoH* by HilD in *S. Typhimurium*. Furthermore, our results support that HilD activates the expression of *phoH* under SPI-1-inducing conditions in part by acting as an anti-H-NS factor. Additionally, our results revealed differential regulation of the *phoH* gene in response to low phosphate; in *E. coli* this regulation is mediated by the PhoB/R system, whereas in *S. Typhimurium* it is independent of PhoB.

RESULTS

The *S. Typhimurium phoH* gene, but not that of *E. coli* K-12, is expressed and regulated by HilD under SPI-1-inducing conditions. The *phoH* structural gene and its encoded protein, PhoH, share identities of 82% and 95%, respectively, between *S. Typhimurium* SL1344 and *E. coli* MG1655. In contrast, the intergenic sequences upstream of *phoH* show a lower identity (54%), and the genomic context is poorly conserved between these two bacteria (Fig. 1A). Therefore, we wondered whether, in addition to the gain of HilD by *S. Typhimurium*, differentiation of the *phoH* regulatory sequence in *S. Typhimurium* was also necessary for the adaptation of the regulation of *phoH* by HilD. To examine this idea, we analyzed the expression of the *phoH* gene from *S. Typhimurium* SL1344 (*phoH*_{STM}) and from *E. coli* MG1655 (*phoH*_{Ec}) in *S. Typhimurium* and *E. coli* strains expressing HilD or not and grown under SPI-1-inducing conditions (LB at 37°C). First, we constructed the *phoH*_{Ec}-*cat* transcriptional fusion (carrying the full-length intergenic sequence upstream of *phoH*_{Ec}), which is equivalent to the *phoH*_{STM}-*cat* transcriptional fusion that we

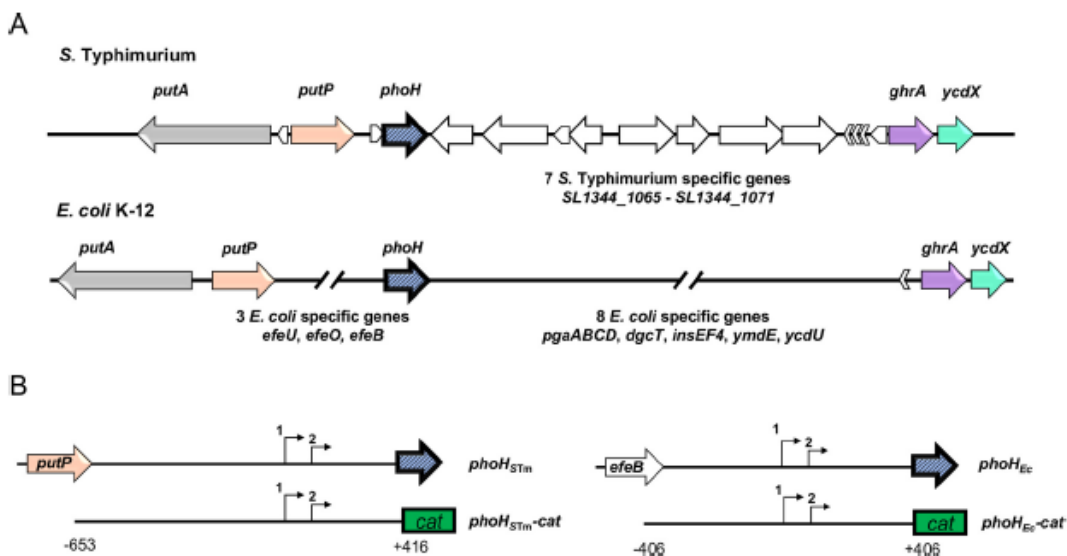


FIG 1 Genomic context of the *phoH_{STm}* and *phoH_{Ec}* genes and schematic representation of the *phoH_{STm}-cat* and *phoH_{Ec}-cat* fusions. (A) Genomic context of the *phoH* gene from the *S. Typhimurium* SL1344 and *E. coli* K-12 MG1655 strains. Genes are shown by arrows. Homologous genes are depicted with the same color. (B) Schematic representation of the *phoH_{STm}-cat* and *phoH_{Ec}-cat* transcriptional fusions containing the full-length upstream region of *phoH* from *S. Typhimurium* SL1344 or *E. coli* K-12 MG1655 strains, respectively. Transcriptional start sites are shown by bent arrows. Positions indicated are relative to the transcriptional start site of promoter 1 of each gene.

previously used to show the regulation of the *phoH_{STm}* gene by HilD (10) (Fig. 1B, Table 1). The expression of both fusions, *phoH_{STm}-cat* and *phoH_{Ec}-cat*, then was quantified in the wild-type (WT) *S. Typhimurium* SL1344 strain and its derivative Δ *hilD* mutant, as well as in the WT *E. coli* MC4100 strain, in the presence of the pK6-HilD plasmid expressing HilD or the pMPM-K6 vector. Consistent with our previous study (10), the expression of the *phoH_{STm}-cat* fusion was significantly decreased in the Δ *hilD*+vector mutant and in the WT *E. coli*+vector strain with respect to the WT *S. Typhimurium*+vector strain; furthermore, it was induced by the pK6-HilD plasmid in both the Δ *hilD* mutant and the WT *E. coli* strain, 4- and 8-fold, respectively (Fig. 2A). In contrast, the *phoH_{Ec}-cat* fusion showed a low expression level in all the strains tested (Fig. 2B), indicating that the expression of the *phoH_{Ec}* gene is not activated by HilD under the growth conditions tested. To confirm these results, we performed a Western blot analysis to monitor the chromosomal expression of the PhoH-FLAG protein (PhoH tagged with a 3 \times FLAG epitope) in the *S. Typhimurium* Δ *hilD* mutant and the WT *E. coli* strain carrying the pBAD-HilD1 plasmid, which expresses HilD from an arabinose-inducible promoter. In agreement with our results obtained with the transcriptional fusions, the *S. Typhimurium* PhoH-FLAG (PhoH_{STm}-FLAG), but not the *E. coli* PhoH-FLAG (PhoH_{Ec}-FLAG), was detected under the conditions assessed; furthermore, the expression of HilD from the pBAD-HilD1 plasmid increased the amount of PhoH_{STm}-FLAG in the Δ *hilD* mutant in a dose-dependent fashion (Fig. 2C). These results show that the *phoH_{STm}* gene, but not the *phoH_{Ec}* gene, is expressed and regulated by HilD under SPI-1-inducing conditions, which supports that both the gain of HilD and differentiation of the regulatory sequence led the *phoH_{STm}* gene to be expressed under conditions relevant for *Salmonella* virulence.

HilD specifically induces the expression of the P1 promoter of *phoH_{STm}*. Previous transcriptomics studies revealed two transcription start sites (TSSs) for the *phoH_{STm}* gene (25, 26). To determine whether these TSSs are really generated by two different promoters (P1 and P2) and whether HilD regulates both or only one of them, we constructed and analyzed the expression of *cat* transcriptional fusions only containing the putative promoter P1

TABLE 1 Bacterial strains and plasmids used in this study^a

Strain or plasmid	Genotype or description	Reference or source
Strains		
<i>S. Typhimurium</i>		
SL1344	Wild type; <i>xyI</i> , <i>hisG</i> , <i>rpsL</i> ; <i>Sm^r</i>	60
DTM142	<i>phoH</i> :3×FLAG- <i>kan</i>	This study
JPTM25	Δ <i>hilD</i>	47
DTM143	Δ <i>hilD phoH</i> :3×FLAG	This study
DTM144	Δ <i>phoB</i> : <i>kan</i>	This study
DTM145	Δ <i>phoB</i>	This study
DTM146	Δ <i>phoB phoH</i> :3×FLAG- <i>kan</i>	This study
DTM150	Δ <i>phoH</i> : <i>kan</i>	This study
DTM151	Δ <i>silE</i> : <i>kan</i>	This study
<i>E. coli</i>		
MG1655	Wild type; prototrophic <i>E. coli</i> K-12	Michael Cashel
DH10 β	Laboratory strain	Invitrogen
MC4100	F ⁻ (<i>araD139</i>) Δ (<i>argF-lac</i>)169 λ ⁻ <i>e14</i> ⁻ <i>flhD5301</i> Δ (<i>fruK-yeR</i>) 725(<i>fruA25</i>) <i>relA1 rpsL150</i> (<i>SmR</i>) <i>rbsR22</i> Δ (<i>fimB-fimE</i>)632(: <i>J51</i>) <i>deoC1</i>	61
BL21/DE3	Strain for expression of recombinant proteins	Invitrogen
JPMC34	MC4100 Δ <i>hns</i>	62
JW0389	BW25113 Δ <i>phoB</i> : <i>kan</i>	63
DTM147	<i>phoH</i> :3×FLAG- <i>kan</i>	This study
DTM148	BW25113 Δ <i>phoB</i>	This study
DTM149	BW25113 Δ <i>phoB phoH</i> :3×FLAG- <i>kan</i>	This study
Plasmids		
pKK232-8	pBR322 derivative containing a promoterless chloramphenicol acetyltransferase (<i>cat</i>) gene, Ap ^r	48
p $phoH_{STm}$ - <i>cat</i>	pKK232-8 derivative containing a <i>phoH</i> - <i>cat</i> transcriptional fusion of <i>S. Typhimurium</i> from nucleotides -653 to +416	10
p $phoH_{E}$ - <i>cat</i>	pKK232-8 derivative containing a <i>phoH</i> - <i>cat</i> transcriptional fusion of <i>E. coli</i> from nucleotides -406 to +406	This study
pP1 $phoH_{STm}$ - <i>cat</i>	pKK232-8 derivative containing a <i>phoH</i> - <i>cat</i> transcriptional fusion of <i>S. Typhimurium</i> from nucleotides -653 to +12	This study
pP2 $phoH_{STm}$ - <i>cat</i>	pKK232-8 derivative containing a <i>phoH</i> - <i>cat</i> transcriptional fusion of <i>S. Typhimurium</i> from nucleotides -5 to +416	This study
pP1 $phoH_{STm}$ -248 + 12- <i>cat</i>	pKK232-8 derivative containing a <i>phoH</i> - <i>cat</i> transcriptional fusion of <i>S. Typhimurium</i> from nucleotides -248 to +12	This study
pP1 $phoH_{STm}$ -67 + 3- <i>cat</i>	pKK232-8 derivative containing a <i>phoH</i> - <i>cat</i> transcriptional fusion of <i>S. Typhimurium</i> from nucleotides -67 to +3	This study
p $phoH_{HIDmut}$ - <i>cat</i>	p $phoH_{STm}$ - <i>cat</i> derivative containing mutations in the predicted HilD-binding site	This study
p $phoH_{P1mut}$ - <i>cat</i>	p $phoH_{STm}$ - <i>cat</i> derivative containing mutations in the P1 promoter	This study
ppst $_{STm}$ - <i>cat</i>	pKK232-8 derivative containing a <i>pstS</i> - <i>cat</i> transcriptional fusion of <i>S. Typhimurium</i> from nucleotides -232 to +352	This study
pBADMycHisC	Expression vector for constructing C-terminal MycHis fusions under an arabinose-inducible promoter, Ap ^r	Invitrogen
pBAD-HilD1	pBADMycHis derivative expressing HilD-MycHis under an arabinose-inducible promoter	47
pMPM-K6 Ω	p15A derivative cloning vector containing an arabinose-inducible promoter, Kan ^r	64
pK6-HilD	pMPM-K6 Ω derivative expressing HilD under an arabinose-inducible promoter, Kan ^r	10
pMAL-HilD1	pMAL-c2X derivative expressing MBP-HilD from a <i>lac</i> promoter, Ap ^r	2
pBAD-H-NS-FH	pBADMycHisC derivative expressing H-NS-FH from an arabinose-inducible promoter, Ap ^r	57
pKD46	pINT-ts derivative expressing red recombinase under an arabinose-inducible promoter, Ap ^r	49
pKD4	pANTsy derivative template plasmid containing the kanamycin cassette for λ Red recombination, Ap ^r	49
pSUB11	pGP704 derivative template plasmid for FLAG epitope tagging	50
pFLP3	pFLP2 derivative template plasmid expressing yeast Flp recombinase, Ap ^r , Tc ^r	51

^aThe coordinates for the *cat* fusions are indicated with respect to the transcriptional start site of *pstS* or that of the P1 promoter of *phoH_{STm}* or *phoH_E*. Ap^r, ampicillin resistance; Sm^r, streptomycin resistance; Kan^r, kanamycin resistance; Tc^r, tetracycline resistance.

(P1 $phoH_{STm}$ -*cat*) or P2 (P2 $phoH_{STm}$ -*cat*) (Fig. 3A). The expression of these fusions was quantified in the WT *S. Typhimurium* strain and its derivative Δ *hilD* mutant carrying the pMPM-K6 vector or the pK6-HilD plasmid expressing HilD under SPI-1-inducing conditions. The two fusions showed expression in the WT+vector strain, indicating that both P1 and P2 promoters are active under the conditions tested, with the P1 promoter 2-fold more active than the P2 promoter (Fig. 3B). However, only the expression of the P1 $phoH_{STm}$ -*cat* fusion

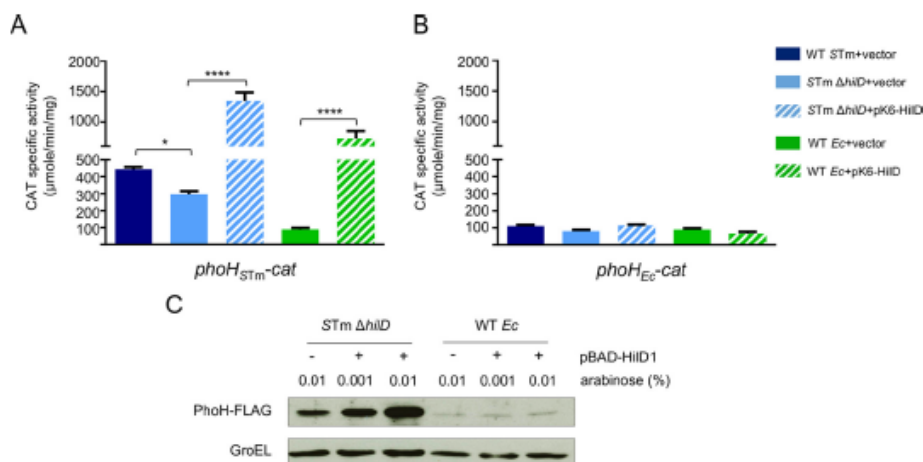


FIG 2 *phoH_{STm}* but not *phoH_{Ec}* is expressed and regulated by HilD under SPI-1-inducing conditions. CAT-specific activity of the *phoH_{STm}-cat* (A) and *phoH_{Ec}-cat* (B) transcriptional fusions, contained in the p*phoH_{STm}-cat* and p*phoH_{Ec}-cat* plasmids, respectively, was determined in the WT *S. Typhimurium* (STm) SL1344 strain, its derivative Δ *hilD* mutant, and the WT *E. coli* (Ec) MC4100 strain, in the presence of the pMPM-K6 vector or the pK6-HilD plasmid expressing HilD from an arabinose-inducible promoter. Expression of HilD from the pK6-HilD plasmid was induced with 0.001% L-arabinose added to the medium at the beginning of cultures. Data represent the averages with standard deviations from three independent experiments performed in duplicate. Statistically different values are indicated (*, $P < 0.05$; ****, $P < 0.0001$). (C) Expression of the PhoH-FLAG protein in the *S. Typhimurium* Δ *hilD* mutant and the WT *E. coli* (Ec) MG1655 strain carrying the vector pBAD_{MycHisC} (-) or the pBAD-HilD1 (+) plasmid, which expresses HilD from an arabinose-inducible promoter, was analyzed by Western blotting using monoclonal anti-FLAG antibodies. As a control, the expression of GroEL was also detected using polyclonal anti-GroEL antibodies. Expression of HilD from the pBAD-HilD1 plasmid was induced with the indicated amounts of L-arabinose added to the medium 2 h postinoculation of cultures. CAT activity and detection of the PhoH-FLAG and GroEL proteins were determined from samples of bacterial cultures grown in LB at 37°C for 9 and 4 h, respectively.

decreased in the Δ *hilD*+vector mutant and was induced by the presence of the pK6-HilD plasmid (Fig. 3B). In agreement with these results, in electrophoretic mobility shift assays (EMSA), purified MBP-HilD protein bound the *phoH_{STm}* fragment contained in the P1*phoH_{STm}-cat* fusion but not that contained in the P2*phoH_{STm}-cat* fusion (Fig. 3C). Together, these results support that HilD regulates only the P1 promoter of the *phoH_{STm}* gene.

Gs-regulatory evolution led to the regulation of the P1 *phoH_{STm}* promoter by HilD.

To delimit the sequence required for the control of P1*phoH_{STm}* by HilD, we constructed and analyzed the expression of two additional *cat* fusions carrying different 5' and 3' deletions regarding the P1*phoH_{STm}-cat*-653 + 12 fusion used initially (Table 1). The expression of these two new fusions, P1*phoH_{STm}-cat*-248 + 12 and P1*phoH_{STm}-cat*-67 + 3, was similarly decreased in the Δ *hilD*+vector mutant with respect to the WT+vector strain and was induced in the Δ *hilD* mutant by the presence of the pK6-HilD plasmid (Fig. 4A). These results reveal that HilD acts on the sequence between positions -67 and +3 of the P1 *phoH_{STm}* promoter (P1*phoH_{STm}*), the sequence contained in the P1*phoH_{STm}-cat*-67 + 3 fusion. In agreement with this conclusion, a HilD-binding site was predicted between positions -59 and -25 of P1*phoH_{STm}* which shows 62% A+T content (Fig. 4B). Previous studies indicate that HilD binding sites have a high A+T content (14, 27).

To confirm that HilD mediates expression of *phoH_{STm}* by acting on the P1 promoter of this gene, the predicted HilD-binding site or the -10 region of the P1 promoter were mutated, as indicated in Fig. 4B, in the *phoH_{STm}-cat*-653 + 416 fusion carrying the full-length regulatory region of *phoH_{STm}* (contains the P1 and P2 promoters), generating the *phoH_{HilDmut}-cat* and *phoH_{P1mut}-cat* fusions, respectively. The expression of the WT and its derivative mutated transcriptional fusions was quantified in the WT *S. Typhimurium* strain and the Δ *hilD* mutant carrying the pMPM-K6 vector or the pK6-HilD plasmid expressing HilD under SPI-1-inducing conditions. As previously observed (Fig. 2A), the WT *phoH_{STm}-cat* fusion showed regulation by HilD, that is, its expression was decreased and increased in the Δ *hilD*+vector and Δ *hilD*+pK6-HilD strains, respectively (Fig. 5A). In contrast, both the *phoH_{HilDmut}-cat* and *phoH_{P1mut}-cat* fusions

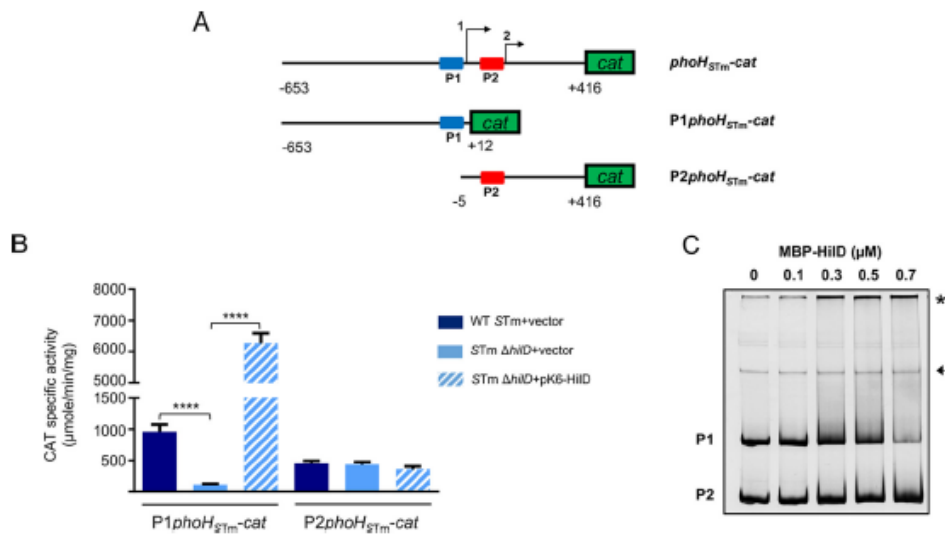


FIG 3 HiID directly regulates the P1 promoter of *phoH*_{STm}. (A) Schematic representation of the P1*phoH*_{STm}-cat and P2*phoH*_{STm}-cat transcriptional fusions containing promoter 1 (P1) or 2 (P2) of *phoH*_{STm}, respectively. Transcriptional start sites (bent arrows) and promoters (blue and red boxes) are shown. Positions indicated are relative to the transcriptional start site of promoter 1. (B) CAT-specific activity of the P1*phoH*_{STm}-cat and P2*phoH*_{STm}-cat transcriptional fusions, contained in the pP1*phoH*_{STm}-cat and pP2*phoH*_{STm}-cat plasmids, respectively, was determined in the WT *S. Typhimurium* (STm) SL1344 strain and its derivative Δ hiID mutant carrying the pMPM-K6 vector or the pK6-HiID plasmid expressing HiID from an arabinose-inducible promoter. Expression of HiID from the pK6-HiID plasmid was induced with 0.001% L-arabinose added to the medium at the beginning of cultures. CAT activity was quantified from samples of bacterial cultures grown in LB at 37°C for 9 h. Data represent averages with standard deviations from three independent experiments performed in duplicate. Statistically different values are indicated (****, $P < 0.0001$). (C) MBP-HiID binding to the *phoH*_{STm} fragments contained in the P1*phoH*_{STm}-cat (P1) and P2*phoH*_{STm}-cat (P2) fusions was analyzed by competitive nonradioactive EMSAs. The DNA-protein complexes are indicated by an asterisk. Nonspecific PCR products are indicated by an arrow.

showed a low expression level that was similar in the three strains tested (Fig. 5A), which indicates that the regulation of *phoH*_{STm} by HiID is lost when the predicted HiID-binding site or the P1 promoter are mutated. EMSAs confirmed that HiID indeed binds the predicted site upstream of the P1 promoter (Fig. 5B to D). The MBP-HiID protein used in the EMSAs apparently forms overly large complexes that remained near the wells of the gel, with or without the tested DNA fragments; the WT P1*phoH*-157/+12 fragment and that carrying the mutated P1 promoter, but not that carrying the mutated HiID-binding sequence, were bound by MBP-HiID (Fig. 5B to D). Together, these results show that HiID positively and specifically regulates the P1 promoter of *phoH*_{STm} by binding a site that overlaps the -35 region of this promoter.

Two promoters have also been reported for the *phoH*_E gene (23) that are located in positions similar to those of the *phoH*_{STm} gene (Fig. 1B). As shown in Fig. 2, the *phoH*_E gene is not regulated by HiID, which indicates that it lacks the HiID-acting site located upstream of P1*phoH*_{STm}. To investigate this notion, we performed an alignment of the corresponding -67/+3 sequence of the *phoH*_{STm} and *phoH*_E P1 promoters (P1 -67/+3 sequences). Interestingly, these sequences share only 45% identity; moreover, the nucleotides of the putative HiID-binding site located on the *S. Typhimurium* sequence are poorly conserved in the *E. coli* sequence (Fig. 4B). Consistent with this, a HiID-binding site was not predicted in the *E. coli* P1 -67/+3 sequence. To explore whether the differences shown by the P1 -67/+3 sequence of *phoH*_{STm} and *phoH*_E are a product of an evolutionary divergence between *Salmonella* and *E. coli* or are specific to the bacterial strains tested, we extended the analysis of the P1 -67/+3 sequence of *phoH* to other *S. enterica* serovars, the *S. bongori* species, and other K12 strains and pathotypes of *E. coli*. As shown in Fig. 4C, phylogenetic analysis based on the P1 -67/+3 sequence of *phoH* grouped the *Salmonella* and *E. coli* strains tested in two different clades. In agreement with these results, the *S. Typhimurium* P1 -67/+3 sequence is better conserved in the *S. enterica* serovars (94 to 100% identity), and to a

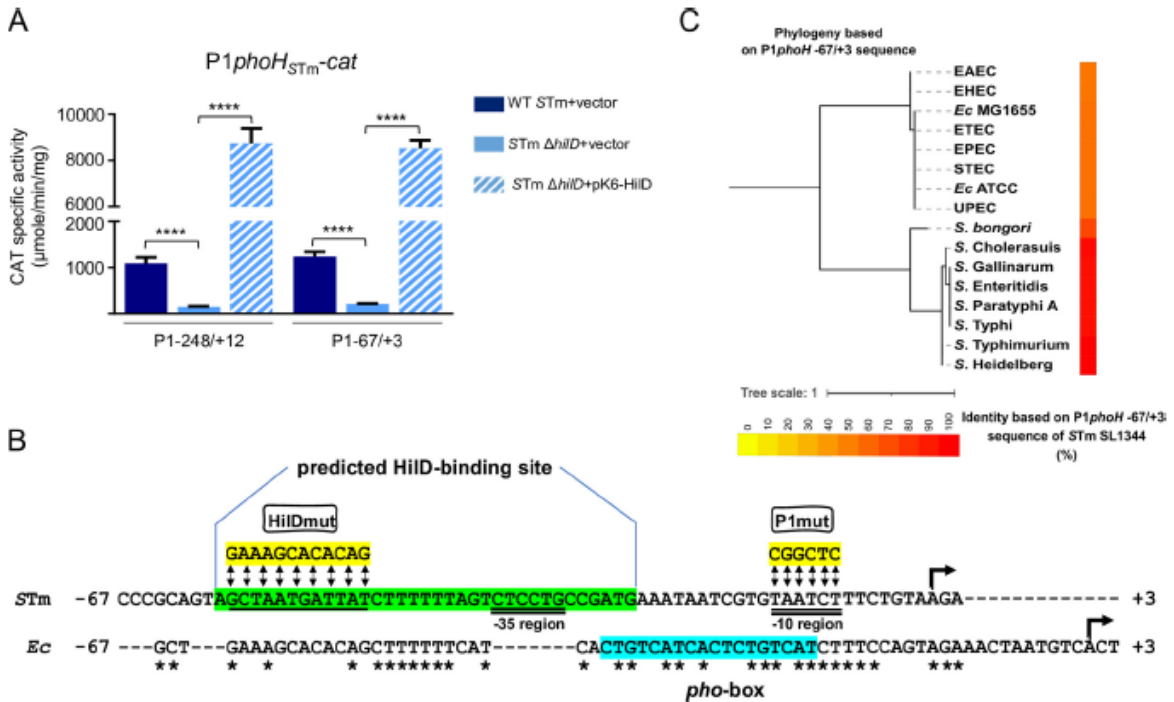


FIG 4 HilD induces the expression of *phoH_{STm}* by acting on a regulatory sequence differentiated between *Salmonella* and *E. coli*. (A) CAT-specific activity of the *P1phoH_{STm}-cat*-248 + 12 and *P1phoH_{STm}-cat*-67 + 3 transcriptional fusions, contained in the *pP1phoH_{STm}-248 + 12-cat* and *pP1phoH_{STm}-67 + 3-cat* plasmids, respectively, was determined in the WT *S. Typhimurium* (STm) SL1344 strain and its derivative Δ hilD mutant carrying the pMPM-K6 vector or the pK6-HiID plasmid expressing HiID from an arabinose-inducible promoter. Expression of HiID from the pK6-HiID plasmid was induced with 0.001% L-arabinose added to the medium at the beginning of cultures. CAT activity was quantified from samples of bacterial cultures grown in LB at 37°C for 9 h. Data represent averages with standard deviations from three independent experiments performed in duplicate. Statistically different values are indicated (****, $P < 0.0001$). (B) Alignment of the P1 -67/+3 sequences of *S. Typhimurium* (STm) SL1344 and *E. coli* (Ec) MG1655. The predicted HiID-binding site on the STm sequence and the PhoB-binding site (*pho*-box) on the *E. coli* sequence as well as the mutations generated in the predicted HiID-binding site and in the -10 region of the P1 *phoH_{STm}* promoter (HiIDmut and P1mut, respectively) are shown. Bent arrows indicate the transcriptional start site of the respective P1 promoter. Asterisks indicate conserved nucleotides. (C) Phylogenetic tree based on the P1 -67/+3 sequence of *E. coli* O104:H4 (EAEc), *E. coli* O157:H7 (EHEc), *E. coli* K-12 MG1655, *E. coli* O78:H11 (ETEC), *E. coli* O127:H6 (EPEC), *E. coli* STEC₇ (STEC), *E. coli* K-12 ATCC 1175, *E. coli* 26-1 (UPEC), *S. bongori*, *S. Choleraesuis* SC-B67, *S. Gallinarum* 9184, *S. Enteritidis* 22510-1, *S. Paratyphi A* ATCC 11511, *S. Typhi* Ty2, *S. Typhimurium* SL1344, and *S. Heidelberg* 41563. Identity with respect to the sequence of *S. Typhimurium* SL1344 is shown with a heat map.

lower extent in *S. bongori* (73% identity), than in the *E. coli* strains assessed (54 to 56% identity) (Fig. 4C). These results suggest that evolution led to the differentiation of the P1 -67/+3 sequence between *Salmonella* and *E. coli*.

Together, our results support that the regulation of the *phoH_{STm}* gene by HiID was adapted by the gain of HiID and the generation of a HiID-acting site through *cis*-regulatory evolution.

***phoH_{STm}* and *phoH_{Ec}* are differentially affected by the H-NS repressor.** HiID induces the expression of target genes by counteracting H-NS-mediated repression; in the absence of H-NS activity, these genes are expressed independently of HiID (2, 3, 16, 27–30). We sought to determine whether HiID follows a similar mechanism to induce the expression of the *phoH_{STm}* gene. *Salmonella hns* mutants show severe growth defects due to the overexpression of SPT-1 and other related genes, and suppressor mutations are generated (31, 32). Thus, to analyze the effect of H-NS on the *phoH_{STm}* gene, we used the WT *E. coli* MC4100 strain and its derivative Δ *hns* mutant that does not show growth defects; the *E. coli* genetic background has been useful to study the regulation of other *Salmonella* genes by H-NS (H-NS of *S. Typhimurium* SL1344 and *E. coli* MC4100 share 95% identity) (16, 30). On the other hand, HiID induces the expression of *phoH_{STm}* in *E. coli* K-12 (Fig. 2A), indicating that no other *Salmonella*-specific regulator is required for the HiID-mediated expression of this gene. We quantified the expression of the *phoH_{STm}-cat* fusion in the WT *E. coli* MC4100 strain and its derivative Δ *hns* mutant carrying the pMPM-K6 vector or the pK6-HiID plasmid expressing

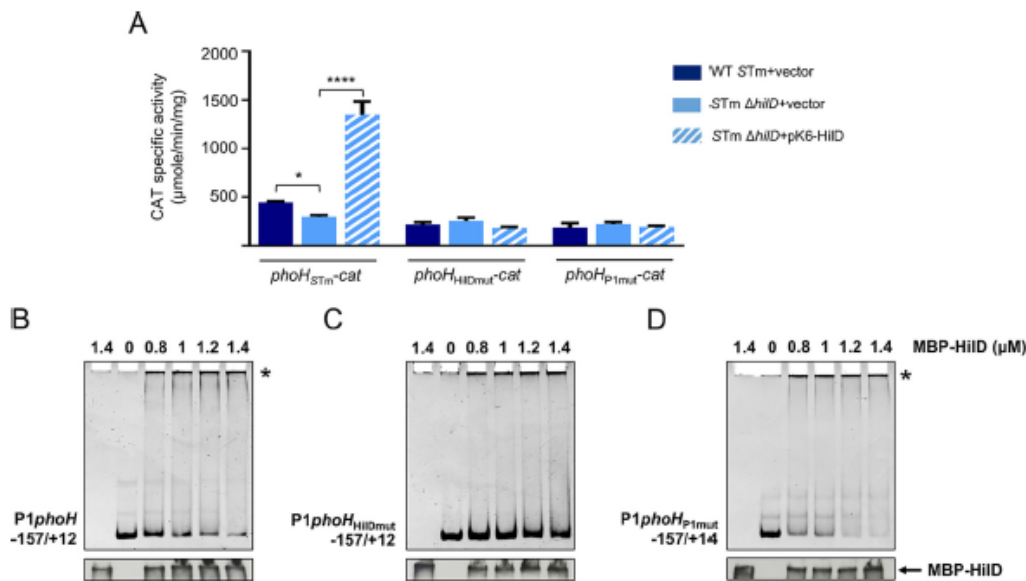


FIG 5 HiiD positively regulates *phoH_{STm}* by binding a site that overlaps the P1 promoter of this gene. (A) CAT-specific activity of the *phoH_{STm}-cat*, *phoH_{HiiDmut}-cat*, and *phoH_{P1mut}-cat* transcriptional fusions, contained in the *pphoH_{STm}-cat*, *pphoH_{HiiDmut}-cat*, and *pphoH_{P1mut}-cat* plasmids, respectively, was determined in the WT *S. Typhimurium* (STm) SL1344 strain and its derivative Δ *hiiD* mutant carrying the pMPM-K6 vector or the pK6-HiiD plasmid expressing HiiD from an arabinose-inducible promoter. Expression of HiiD from the pK6-HiiD plasmid was induced with 0.001% L-arabinose added to the medium at the beginning of cultures. CAT activity was quantified from samples of bacterial cultures grown in LB at 37°C for 9 h. Data represent the averages with standard deviations from three independent experiments performed in duplicate. Statistically different values are indicated (*, $P = 0.0148$; ****, $P < 0.0001$). MBP-HiiD binding to the WT *P1phoH_{STm}-157/+12* fragment (B), the *P1phoH_{HiiDmut}-157/+12* fragment mutated in the predicted HiiD-binding site (C), and the *P1phoH_{P1mut}-157/+14* fragment mutated in the P1 promoter (D) was analyzed by nonradioactive EMSAs. The upper panels show the free DNA and the DNA-protein complexes stained with ethidium bromide, and the lower panels show the immunodetection of MBP-HiiD at the top of the lines using anti-MBP monoclonal antibodies. The DNA-protein complexes are indicated by an asterisk.

HiiD, grown under SPI-1-inducing conditions. As a control, the expression of this fusion was also tested in the WT *S. Typhimurium* strain carrying the pMPM-K6 vector. In line with the results described above (Fig. 2A), the expression of the *phoH_{STm}-cat* fusion was induced in the WT *S. Typhimurium*+vector strain as well as in the WT *E. coli*+pK6-HiiD strain but not in the *E. coli*+vector strain (Fig. 6A). Notably, in the *E. coli* Δ *hns*+vector strain the expression of the *phoH_{STm}-cat* fusion reached levels similar to those in the WT *S. Typhimurium* strain (Fig. 6A). These results show that H-NS represses the expression of *phoH_{STm}* and that in the absence of H-NS this gene is expressed independently of HiiD, which supports that HiiD induces expression of *phoH_{STm}* by counteracting H-NS-mediated repression. Nevertheless, the presence of the pK6-HiiD plasmid further increased (2-fold) the expression of the *phoH_{STm}-cat* fusion in the *E. coli* Δ *hns* mutant (Fig. 6A), indicating that HiiD also induces partial expression of the *phoH_{STm}* gene by a mechanism independent of H-NS.

We next assessed whether H-NS also represses the expression of the *phoH_{Ec}* gene. For this, the expression of the *phoH_{Ec}-cat* fusion was quantified in the WT *E. coli* and *E. coli* Δ *hns* strains grown under SPI-1-inducing conditions. The *phoH_{Ec}-cat* fusion showed very low expression levels in both *E. coli* strains (Fig. 6A), showing that, in contrast to that observed for *phoH_{STm}*, the expression of *phoH_{Ec}* is not induced by the absence of H-NS under the conditions tested.

EMSA were performed to determine whether H-NS regulates *phoH_{STm}* directly. As could be expected, purified H-NS-FH (H-NS-Flag-His₆) protein bound the DNA fragment spanning the entire regulatory region of *phoH_{STm}* but not that of *phoH_{Ec}*, at the concentrations tested (Fig. 6B). The DNA-H-NS-FH complexes formed with the entire regulatory region of *phoH_{STm}* seem to be very large, since they were retained near the wells of the gel (Fig. 6B); with a shorter fragment of the regulatory region of *phoH_{STm}*, the DNA-H-NS-FH complexes were detected within the gel (Fig. 6C). H-NS is known to bind A+T-rich sequences (33); intriguingly,

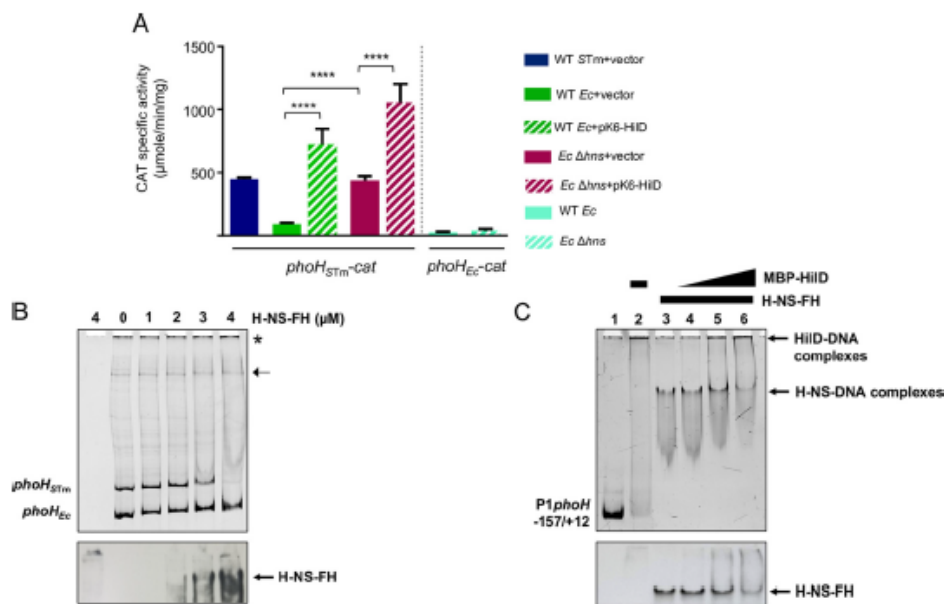


FIG 6 HiID antagonizes H-NS-mediated repression on *phoH_{STm}*. (A) CAT-specific activity of the *phoH_{STm}-cat* transcriptional fusion, contained in the *pphoH_{STm}-cat* plasmid, was evaluated in the WT *S. Typhimurium* (STm) SL1344 strain as well as in the WT *E. coli* (*Ec*) MC4100 strain and its derivative Δ*hns* mutant in the presence of the pMPM-K6 vector or the pK6-HiID plasmid expressing HiID from an arabinose-inducible promoter. CAT-specific activity of the *phoH_{Ec}-cat* transcriptional fusion, contained in the *pphoH_{Ec}-cat* plasmid, was evaluated in the WT *E. coli* (*Ec*) MC4100 strain and its derivative Δ*hns* mutant. Expression of HiID from the pK6-HiID plasmid was induced with 0.001% L-arabinose added to the medium at the beginning of cultures. CAT activity was quantified from samples of bacterial cultures grown in LB at 37°C for 9 h. Data represent the average with standard deviations from three independent experiments performed in duplicate. Statistically different values are indicated (****, $P < 0.0001$). (B) H-NS-FH binding to the *phoH* fragments contained in the *phoH_{STm}-cat* and *phoH_{Ec}-cat* fusions, carrying the full-length regulatory region of *phoH_{STm}* and *phoH_{Ec}*, respectively, was analyzed by competitive nonradioactive EMSAs. The DNA-protein complexes are indicated by an asterisk. Nonspecific PCR products are indicated by an arrow. (C) Competitive nonradioactive EMSAs between HiID-MBP and H-NS-FH on the P1*phoH*-157/+12 fragment of *phoH_{STm}*. Purified H-NS-FH protein was added at 4 μM (lanes 3 to 6), and purified MBP-HiID protein was added at 0.4, 0.8, and 1.2 μM (lanes 4 to 6, respectively). No protein was added in lane 1, and MBP-HiID was added at 1.2 μM in lane 2. In EMSAs, the upper panels show the free DNA and the DNA-protein complexes stained with ethidium bromide, whereas the lower panels show the immunodetection of H-NS-FH in the DNA-protein complexes at the top (B) or within the lanes of the gels (C), using anti-FLAG monoclonal antibodies.

both the regulatory region of *phoH_{STm}* and that of *phoH_{Ec}* show high A+T content, 57% and 55%, respectively. Next, we analyzed by competitive EMSAs whether MBP-HiID can displace H-NS-FH from *phoH_{STm}*. Binding reactions containing the P1*phoH*-157/+12 fragment of *phoH_{STm}* were first incubated with a constant concentration of H-NS-FH, and then increasing concentrations of MBP-HiID were added. Binding reactions containing only H-NS-FH or MBP-HiID were also tested. The DNA-H-NS-FH complex was shifted by MBP-HiID to a slower-migrating complex that remained near the wells of the gel, similar to the complex formed only by MBP-HiID; furthermore, MBP-HiID decreased the amount of H-NS-FH bound to the P1*phoH*-157/+12 fragment (Fig. 6C). These results indicate that HiID displaces H-NS from *phoH_{STm}*.

In all, these results support that *cis*-regulatory evolution led to the repression of *phoH_{STm}* by H-NS, which is involved in the regulation of this gene by HiID.

***phoH_{STm}* and *phoH_{Ec}* are differentially regulated in response to inorganic phosphorus.** The *phoH_{Ec}* gene belongs to the phosphoregulon; its expression is induced by the PhoR/B two-component system in response to inorganic phosphorus (P_i) starvation (22, 23). It was therefore of interest to test whether the *phoH_{STm}* gene that was recruited into the HiID regulon conserves the ancestral regulation by the PhoR/B system in response to low P_i . To investigate this notion, we quantified the expression of the *phoH_{STm}-cat* fusion in the WT *S. Typhimurium* strain and its isogenic Δ*phoB* mutant grown in N-minimal medium (N-MM) containing low or high concentrations of P_i . Surprisingly, the expression of the *phoH_{STm}-cat* fusion was induced

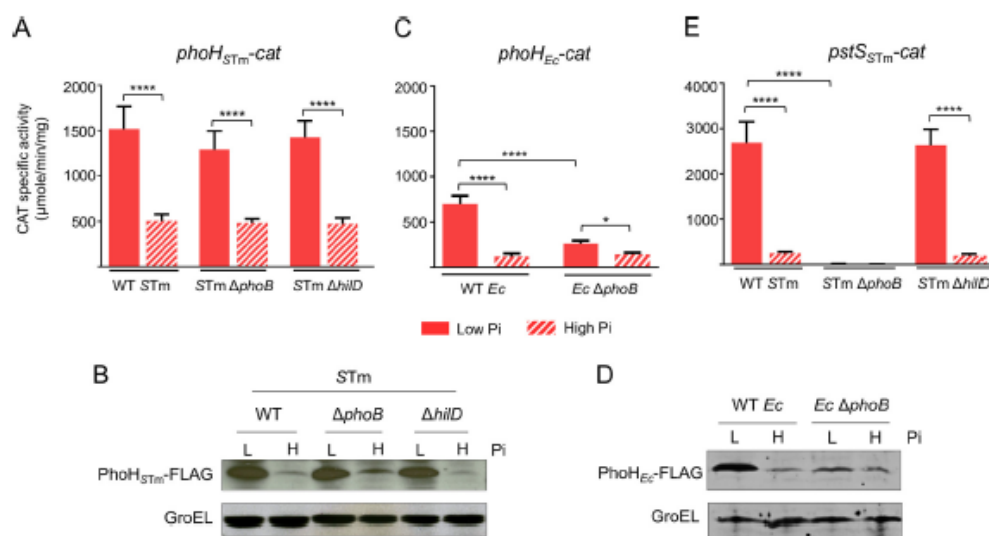


FIG 7 Expression of *phoH*_{STm} is activated by low P_i independently of either PhoB or HilD. CAT-specific activity of the *phoH*_{STm}-*cat* (A) and *pstS*_{STm}-*cat* (E) transcriptional fusions, contained in the *pphoH*_{STm}-*cat* and *ppstS*_{STm}-*cat* plasmids, respectively, was determined in the WT *S. Typhimurium* (STm) SL1344 strain and its derivative Δ *phoB* and Δ *hilD* mutants. *pstS* is known to be regulated by PhoB; thus, it was tested as a positive control. (C) CAT-specific activity of the *phoH*_{Ec}-*cat* transcriptional fusion, contained in the *pphoH*_{Ec}-*cat* plasmid, was determined in the WT *E. coli* (Ec) BW25113 strain and its derivative mutant. Data represent the average with standard deviation from three independent experiments performed in duplicate. Statistically different values are indicated (*, $P < 0.0108$; ****, $P < 0.0001$). The expression of the PhoH_{STm}-FLAG protein in the WT *S. Typhimurium* (STm) SL1344 strain and its derivative Δ *phoB* and Δ *hilD* mutants (B), as well as the expression of the PhoH_{Ec}-FLAG protein in the WT *E. coli* (Ec) MG1655 strain and its derivative Δ *phoB* mutant (D), was analyzed by Western blotting using monoclonal anti-FLAG antibodies. As a control, the expression of GroEL was also detected using polyclonal anti-GroEL antibodies. CAT activity and detection of the PhoH-FLAG and GroEL proteins were determined from samples of bacterial cultures grown for 16 h at 37°C in N-MM containing low (L) or high (H) P_i .

by low P_i in both the WT strain and the Δ *phoB* mutant (Fig. 7A). Similar results were obtained by analyzing the expression of the PhoH_{STm}-FLAG protein (Fig. 7B). In contrast, the expression of the PhoH_{Ec}-FLAG protein or the *phoH*_{Ec}-*cat* fusion was induced by low P_i in the WT *E. coli* strain but not, or only slightly, in its derivative Δ *phoB* mutant (Fig. 7C and D). In agreement with these results, an *in silico* analysis identified the previously reported *pho*-box (PhoB-binding site) on the regulatory sequence of *phoH*_{Ec} but did not predict a *pho*-box on the corresponding sequence of *phoH*_{STm} (Fig. 4B) (23). The *S. Typhimurium* sequence conserves only 10 of the 18 nucleotides forming the *E. coli* *pho*-box (Fig. 4B). These results indicate that both *phoH*_{Ec} and *phoH*_{STm} are similarly regulated by P_i but through different mechanisms; the one for *phoH*_{Ec} involves PhoB and that for *phoH*_{STm} does not.

Next, we asked whether the regulation by P_i independent of PhoB also acts on the *pstS* gene, which has been shown to belong to the phosphate regulon and to be regulated by PhoB in different bacteria; this gene encodes a component of a high-efficiency P_i transporter (24). To know this, a *cat* transcriptional fusion of the *S. Typhimurium* SL1344 *pstS* (*pstS*_{STm}) gene was constructed and assessed in the same bacterial strains and growth conditions as in the previous experiment. The expression of the *pstS*_{STm}-*cat* fusion was induced by low P_i in the WT *S. Typhimurium* strain but not in its derivative Δ *phoB* mutant (Fig. 7E), indicating that the *pstS*_{STm} gene is regulated by P_i starvation through PhoB. Consistent with this, a computational analysis identified on *pstS*_{STm} (data not shown) the *pho*-box previously reported for the *E. coli* gene (34).

As expected, according to different studies indicating that HilD does not affect expression of target genes when *S. Typhimurium* is grown in minimal medium (2, 25), the regulation of *phoH*_{STm} and *pstS*_{STm} by P_i was similar in the WT strain and its derivative Δ *hilD* mutant (Fig. 7A, B, and E).

Taken together, these results support that the *phoH*_{STM} gene evolved to be regulated by P₁ through a PhoB-independent mechanism.

DISCUSSION

Differential regulation of homologous genes is an important mechanism for phenotypic variability among closely related bacteria (4, 35–38). In this study, we further define the mechanism by which HilD induces the expression of *phoH*_{STM} and show that both the gain of HilD and *cis*-regulatory evolution adapted this regulation in *S. Typhimurium*, leading to differential expression of *phoH* between *S. Typhimurium* and *E. coli* K-12.

Our data indicate that in the absence of the H-NS repressor, the *phoH*_{STM} gene reached WT expression levels independently of HilD. We found that H-NS binds to and represses the expression of the *phoH*_{STM} gene but not the *phoH*_{Ec} gene. Moreover, we determined that HilD displaces H-NS from the *phoH*_{STM} gene. These results support that HilD induces the expression of *phoH*_{STM} by antagonizing the negative effect of H-NS, a mechanism that HilD follows to induce the expression of several other target genes (2, 9, 16, 27–29, 39). Interestingly, we observed that the overexpression of HilD further increased the expression of the *phoH*_{STM} gene in the absence of H-NS, which suggests that HilD, besides acting as an anti-H-NS factor, could antagonize the action of an additional repressor or improve the RNA polymerase binding on the promoter of this gene. In agreement with this notion, a previous report indicates that HilD counteracts repression exerted by the nucleoid-associated protein Hha on the *rtsA* gene (27). Furthermore, evidence from another study suggests that HilD recruits the RNA polymerase on the *hilA* promoter (40).

A previous transcriptome sequencing (RNA-seq) analysis revealed two transcriptional start sites for the *phoH*_{STM} gene (25, 26). Accordingly, our results show that two promoters (P1 and P2) transcribe this gene under SPI-1-inducing conditions. We found that HilD positively regulates the P1 promoter, but not the P2 promoter, by binding a site that overlaps the –35 region of the P1 promoter. To our knowledge, not one regulatory mechanism other than that mediated by the PhoB/R system (see below) had been defined for the *phoH* gene in any other bacteria.

We detected only background expression levels for the *phoH*_{Ec} gene under SPI-1-inducing conditions, even in the presence of HilD. In agreement with this finding, computational analyses revealed that the regulatory sequence required for the HilD-mediated expression of the *phoH*_{STM} gene (P1 –67/+3 sequence) is poorly conserved in the *phoH*_{Ec} gene, including the HilD-binding sequence on *phoH*_{STM}. Moreover, a phylogenetic analysis based on the P1 –67/+3 sequence of *phoH* grouped *Salmonella* and *E. coli* strains in two different clades. Thus, our results support that both the acquisition of HilD and regulatory evolution of the P1 –67 to +3 sequence adapted the regulation of *phoH* by HilD in *S. Typhimurium*, which led to this gene being expressed under growth conditions relevant for *Salmonella* virulence. Interestingly, *cis*-regulatory evolution also adapted repression of *phoH*_{STM} by H-NS, which is involved in the HilD-mediated expression of this gene. It is tempting to speculate that the regulation by HilD of other ancestral genes, like *flhDC* and *yobH*, was also adapted by *cis*-regulatory evolution. On the other hand, *cis*-regulatory changes in *S. Typhimurium* with respect to *S. bongori* led the *srfN*, *ugtL*, and *flhDC* genes to be regulated by the SPI-2 transcriptional regulator SsrB and thus to have a role in *S. Typhimurium* virulence (36–38). Thus, these reports indicate that *cis*-regulatory changes have played an important role in the evolution of *Salmonella* pathogenicity. It is reasonable to think that the integration of the *phoH*_{STM} gene into the HilD regulon was favorable for *S. Typhimurium* virulence. Our results indicate that the deletion of *phoH*_{STM} slightly decreases the early intestinal colonization but does not affect the systemic infection of mice by *S. Typhimurium* (Fig. 8A and B). We observed similar phenotypes with the deletion of the *siiE* gene (Fig. 8), which encodes a giant nonfimbrial adhesin shown to be necessary for intestinal colonization (41, 42). In contrast, the deletion of *phoH*_{STM} did not affect the *S. Typhimurium* invasion of HeLa cells or RAW264.7 mouse macrophages (data not shown). Further studies into the possible role of *phoH* in *S. Typhimurium* pathogenicity are required. Even when *phoH* is conserved in many bacteria, its biological function remains unknown in all of them.

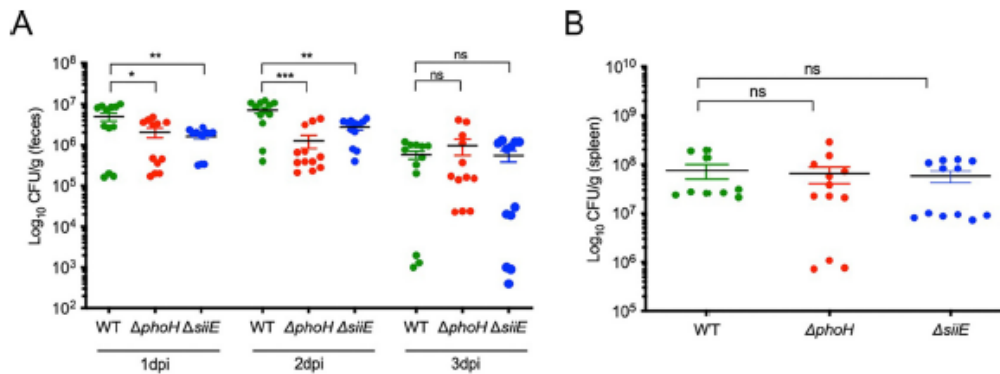


FIG 8 Effect of *phoH_{STM}* in the intestinal colonization and systemic infection of mice by *S. Typhimurium*. Groups of 12 streptomycin-pretreated mice were orally inoculated with the WT *S. Typhimurium* strain or its derivative Δ *phoH* or Δ *siiE* mutant. (A) Numbers of CFU/g from feces were determined at 1, 2, and 3 days postinfection (dpi). (B) Numbers of CFU/g from the spleen were determined at 1 day postinfection. Bars denote the standard errors of the averages for each experimental group. Statistically different values are indicated (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

We found an additional trait for *phoH_{STM}* that was also generated by *cis*-regulatory evolution: the expression of this gene was induced by low P_i independently of the PhoR/B two-component system. A previous report indicates that only a small number of the *S. Typhimurium* genes that are induced by low P_i belong to the PhoB/R system regulon (43). Thus, *S. Typhimurium* seems to have a regulatory system alternative to PhoB/R to activate *phoH_{STM}* and many other genes in response to P_i starvation. Our results indicate that HilD, as well as PhoP and SsrB, two transcriptional regulators that induce expression of *Salmonella* virulence genes in N-MM containing low P_i , are not involved in the activation of *phoH_{STM}* by low P_i (data not shown). Transcriptomic studies have shown that the expression of *phoH_{STM}* is induced by various types of stress that *S. Typhimurium* faces inside hosts, such as high concentrations of NaCl, low Fe^{2+} , anaerobiosis, and exposure to peroxide or nitric oxide, among others (25). Various regulators could coordinate to activate the expression of *phoH_{STM}* in response to different cues, which remains to be determined.

Beyond examples for specific genes, differential regulation of multiple genes mediated by a transcriptional regulator has been described among closely related bacteria. For instance, the SlyA and Ler regulons are different between *S. Typhimurium* and *E. coli* (44) and between enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli* strains (45). Moreover, mechanisms underlying transcriptional control evolved from prokaryotes to eukaryotes (46).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. Bacterial strains used in this study are shown in Table 1. Bacterial cultures for the determination of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity or for the Western blot assays were grown in 250-mL flasks containing 50 mL of LB or N-minimal medium (N-MM), which were inoculated with a 100-fold dilution of an overnight culture, as described previously (2, 47). To evaluate the low and high P_i conditions, KH_2PO_4 in N-MM was used at concentrations of 64 μ M and 640 μ M, respectively. The antibiotics ampicillin (200 μ g/mL), streptomycin (100 μ g/mL), and kanamycin (20 μ g/mL) were added to growth media as needed.

Construction of plasmids. Plasmids and primers used in this study are listed in Tables 1 and 2, respectively. To construct the p*phoH_{STM}*-cat plasmid, the intergenic sequence upstream *phoH_{STM}* was amplified by PCR with the primer pair *phoH-Fw41/phoH-Rv42*, using chromosomal DNA from the WT *E. coli* K-12 MG1655 strain as the template. To construct the p*P1phoH_{STM}*-cat, p*P2phoH_{STM}*-cat, and p*phoH_{STM}*-248 + 12-cat plasmids, the corresponding sequence upstream of *phoH_{STM}* (−653 to +12, −5 to +416, and −248 to +12, respectively, with respect to the *P1* promoter) was amplified by PCR with the primer pairs *phoH-Fw/phoH-Rv14*, *phoH-Fw15/phoH-Rv*, and *phoH-Fw27/phoH-Rv14*, respectively, using chromosomal DNA from WT *S. Typhimurium* SL1344 strain as the template. The p*phoH_{STM}*-cat and p*phoH_{STM}*-cat plasmids, carrying mutations in the predicted HilD-binding site and the *P1* promoter, respectively, were constructed by overlapping PCR using chromosomal DNA from the WT *S. Typhimurium* strain as the template. First, two PCR products were obtained for each plasmid, with the primer pairs *phoH-Fw/phoH-Rv80* and *phoH-Fw79/phoH-Rv* for p*phoH_{STM}*-cat and with the primer pairs *phoH-Fw/phoH-Rv84* and *phoH-Fw83/phoH-Rv* for p*phoH_{STM}*-cat. The PCR products were purified, and those for each plasmid were mixed and used as the template for a second PCR with the external primers *phoH-*

TABLE 2 Primers used in this study

Primer	Sequence ^a (5'-3')	Target gene	RE ^b
For <i>cat</i> transcriptional fusion			
phoH-Fw41	CGA <u>GGATCC</u> TGGATATGGGTTGCTGTTG	<i>phoH_{Ec}</i>	BamHI
phoH-Rv42	CGA <u>AGCTTC</u> CATGGAGACACCTTGAGTTG	<i>phoH_{Ec}</i>	HindIII
phoH-Fw	CGA <u>GGATCC</u> AATATGGCTGGCTGGATCTG	<i>phoH_{S1m}</i>	BamHI
phoH-Rv14	CGA <u>AGCTTC</u> TGTCACTCTTACAGAAAGATTAC	<i>phoH_{S1m}</i>	HindIII
phoH-Fw15	CGA <u>GGATCC</u> TGTAAGAGACTGACAATGACGC	<i>phoH_{S1m}</i>	BamHI
phoH-Rv	CGA <u>AGCTTC</u> CATGGATAGCACCTTGAGT	<i>phoH_{S1m}</i>	HindIII
phoH-Fw27	CGA <u>GGATCC</u> TGACGCAATAGAGTAATGACAAAA	<i>phoH_{S1m}</i>	BamHI
phoH-Fw37	GATCCCGCAGTAGCTAATGATTATCTTTTTCCTGCTGCGATGAAATAATCGTGAATCTTTC TGTAAGAA	<i>phoH_{S1m}</i>	
phoH-Rv38	AGCTTCTTACAGAAAGATTACACGATTATTTTATCCTGGCAGGAGACTAAAAAGATAATCATTAGCT ACTGCGGGG	<i>phoH_{S1m}</i>	
phoH-Fw79	CAGCATTAAATACCCGACAGTAGAAAGCACACAGCTTTTTTGTCTCCTGCCGATG	<i>phoH_{S1m}</i>	
phoH-Rv80	CATCGCAGGAGACTAAAAAGCTGTGTGCTTCTACTGCGGGTATTAATGCTG	<i>phoH_{S1m}</i>	
phoH-Fw83	CTGCCGATGAAATAATCTGTGGCTCTTCTGTAAGAGACTGACAATG	<i>phoH_{S1m}</i>	
phoH-Rv84	CATTGTCAGTCTTACAGAAAGCCGACGATTATTTTATCATCGGCAG	<i>phoH_{S1m}</i>	
phoH-Fw17	CGA <u>GGATCC</u> AGCGATGGGAGAGAGGACAC	<i>phoH_{S1m}</i>	BamHI
pstS-Fw71	CGA <u>GGATCC</u> CTCTTTGTCTGGCGATCC	<i>pstS_{S1m}</i>	BamHI
pstS-Rv72	CGA <u>AGCTTC</u> GAAACAGGCCTTCTGATTACG	<i>pstS_{S1m}</i>	HindIII
For gene deletion			
phoH-H1P1	GGCTTACAAGGAAGCCAACCTCAGATGTGTGTGCGCATAATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	<i>phoH_{S1m}</i>	
phoH-H2P2	CGGGCTCTGAAAGTCAATGCTATATTAGCTGTATCGGTGAAGCATATGAATACTCCCTTAG	<i>phoH_{S1m}</i>	
siIE-H1P1	ATGGGAAATAAAAGCATACAAAAGTTTTTCCGATCAAAATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	<i>siIE</i>	
siIE-H2P2	TTATGCGTGTCTTCTTGATTATCTACAGGTAGCGTAACTTCCATATGAATATCTCCCTAG	<i>siIE</i>	
SphoB H1P1	CGACTAACAGGGCAAATATGGCGAGACGTATTCGGTCTGATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	<i>phoB_{S1m}</i>	
SphoB H2P2	CAACTGGCGGAAAGGCATTAAAAGCGGGTCCGAAACACACCATATGAATATCTCCCTTAG	<i>phoB_{S1m}</i>	
For gene FLAG tagging			
phoH5FlagFw	GCGCTCGGCCTTTGTCAGCGAAGCGCTTACGCATACAGCGACTACAAGACCAATGACGGT	<i>phoH_{S1m}</i>	
phoH5FlagRv	ACAAAGCCCGGTTTCCCGGGCTCGAAAGTCAATGCTATACATATGAATACTCCCTTAGTTC	<i>phoH_{S1m}</i>	
phoHEcFlagFw	CGTTCCGCACTTTGCCAACGTAACGTCATGCCATACAGTACTACAAGACCATGACGGT	<i>phoH_{Ec}</i>	
phoHEcFlagRv	ACAAAGCCCGGTTTCGCCCAGGCTTGCACCGATAACACACCATATGAATATCTCCCTTAGTTC	<i>phoH_{Ec}</i>	

^aUnderlined letters indicate the respective restriction enzyme site in the primer. The sequences corresponding to the template pKD4 or pSUB11 plasmids (Table 1) are in italics.

^bRE, restriction enzyme for which a site was generated in the primer.

Fw and phoH-Rv. To construct the *ppstS_{S1m}-cat* plasmid, the intergenic sequence upstream of *pstS_{S1m}* was amplified by PCR with the primer pair *pstS-Fw71/pstS-Rv72*, using chromosomal DNA from WT *S. Typhimurium* SL1344 strain as the template. All the PCR products were purified and digested with BamHI and HindIII enzymes and then cloned into the same restriction sites of the pK232-8 vector, which carries a promoterless *cat* gene (48). The *pphoH_{S1m}-67 + 3-cat* plasmid was constructed with the complementary primers *phoH-Fw37* and *phoH-Rv38*. Briefly, these primers were mixed in a 1:1 ratio, heated to 95°C for 10 min, and then cooled to room temperature for 1 h. The obtained double-strand product carries cohesive ends for its cloning into the BamHI and HindIII restriction sites of the pK232-8 vector (48).

Construction of chromosomal deletion and 3×FLAG-tagged mutant strains. The *phoB*, *phoH*, and *siIE* genes were replaced with a selectable kanamycin resistance cassette in the *S. Typhimurium* SL1344 strain by the λ Red recombinase system, as reported previously (49), using the primers shown in Table 2, generating the DTM144, DTM150, and DTM151 strains, respectively. The chromosomal *phoH* gene was 3×FLAG-tagged in the WT *S. Typhimurium* SL1344 strain as well as in the JPTM25, DTM145, MG1655, and DTM148 strains, using a previously reported method based on the λ Red recombinase system (50), and the primers are shown in Table 2, generating the DTM142, DTM143, DTM146, DTM147, and DTM149 strains, respectively. The DTM145 and DTM148 strains were generated by removing the kanamycin resistance cassette from the DTM144 and JW0389 strains, respectively, using the pFLP3 plasmid expressing the FLP recombinase, as described previously (51). All modified strains were verified by PCR amplification and sequencing.

CAT assays. The assays for CAT-specific activity were performed as described previously (52).

Western blotting. Western blot assays were conducted as described previously (47), with minor modifications. Briefly, to detect PhoH-FLAG, sonicated cell extracts were prepared from samples of bacterial cultures grown in LB or N-MM at the indicated time. Proteins were separated on SDS-15% polyacrylamide gels. Immunoblots were performed with monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma) or polyclonal anti-GroEL (StressGen) antibodies at 1:5,000 and 1:100,000 dilutions, respectively. To detect MBP-HilD or H-NS-FH in the BMSAs monoclonal anti-MBP (Sigma) or monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma) antibodies were used at a dilution of 1:3,000. Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse and anti-rabbit (Pierce) diluted at 1:10,000 were used as secondary antibodies. Reaction bands on membranes were developed with the Western Lightning chemiluminescence reagent plus (Perkin-Elmer) and exposition to Kodak X-Omat films.

Sequence analysis. BLASTP and Clustal Omega2 (EMBL-EBI) were used to compare amino acid and nucleotide sequences, respectively. The phylogenetic tree based on the P1*phoH*-67 + 3 sequence was generated with the IQ-TREE (53) and interactive Tree of Life (v6) (54) software using default parameters. Prediction of HiID-binding sites was performed with the previously reported position-specific scoring matrices, representing HiID-binding consensus sequences (10), using the matrix-scan program (55) with a *P* value of $1e-3$. Prediction of PhoB-binding site was accomplished with the BPROM tool of the Softberry software (56).

Expression and purification of MBP-HiID and H-NS-FH. The maltose binding protein (MBP)-HiID and the H-NS-FLAG-His₆ (H-NS-FH) protein were expressed in the *E. coli* BL21/DE3 strain containing the pMAL-HiID1 or pBAD-H-NS-FH plasmid and purified by using amylose-agarose or NP⁺-nitrilotriacetic-agarose affinity columns, respectively, as described previously (2).

EMSA. The fragments P1 and P2, spanning the *phoH*_{STm} sequences contained in the P1*phoH*_{STm}-cat and P2*phoH*_{STm}-cat fusions, were obtained by PCR amplification using the primer pairs *phoH*-Fw/*phoH*-Rv14 and *phoH*-Fw15/*phoH*-Rv, respectively, and chromosomal DNA from the WT *S. Typhimurium* SL1344 strain as the template. The WT and mutated P1*phoH*-157/+12 fragments were obtained by PCR using the primer pairs *phoH*-Fw17/*phoH*-Rv14 and *phoH*-Fw17/*phoH*-Rv84 and the DNA from the p*phoH*_{STm}-cat (WT), p*phoH*_{HiIDmut}-cat (mutations in the predicted HiID-binding site), or p*phoH*_{P1mut}-cat (mutations in the P1 promoter) plasmids as the template. The fragments spanning the *phoH*_{STm} or *phoH*_{STm} full-length regulatory region, contained in the *phoH*_{STm}-cat or *phoH*_{STm}-cat fusions, were obtained by PCR using the primer pairs *phoH*-Fw/*phoH*-Rv and *phoH*-Fw41/*phoH*-Rv42 and chromosomal DNA from WT *S. Typhimurium* SL1344 and *E. coli* MG1655 strains as the template, respectively. The final PCR products were purified with the Zymo Research DNA Clean & Concentrator kit (ZYMO RESEARCH). Protein-DNA binding reactions with purified MBP-HiID and/or H-NS-FH proteins were analyzed as described previously (2, 57). For competitive EMSAs, the WT P1*phoH*-157/+12 fragment was first incubated with 4 μM H-NS-FH for 15 min and then incubated with increasing concentrations of MBP-HiID for an additional 20 min. Binding mixtures were electrophoretically separated in 6% nondenaturing acrylamide in 0.5× Tris-borate-EDTA buffer at room temperature. DNA bands were visualized by staining with ethidium bromide in an Alpha-Imager UV transilluminator (Alpha Innotech Corp.). MBP-HiID and H-NS-FLAG were detected on the DNA/protein complexes by Western blotting.

Mouse infection assays. Mouse experiments were conducted according to the standard operating protocols approved by the International Committee for Animal Care and Use from CICUAL-UNAM and by the Official Mexican Norm NOM-062-Z00-1999. Pathogen-free BALB/c female mice (6 to 7 weeks old) were obtained from the Experimental Medicine Research Unit, School of Medicine, UNAM, Mexico. Maintenance, treatment with 50 mg of streptomycin, infection, and euthanasia of the mice, as well as the counting of the number of CFU per gram from feces or the spleen were performed as described previously (57, 58). Groups of 12 streptomycin-pretreated mice were infected by the orogastric route with bacterial suspensions containing 1.0×10^8 CFU of the WT *S. Typhimurium* strain or its derivative Δ *phoH* and Δ *siIE* mutants, prepared in sterile 1× phosphate-buffered saline.

Cell infection assays. Invasion of HeLa cells or RAW264.7 mouse macrophages was tested by gentamicin assays, as described previously (57, 59).

Statistical analysis. Statistical analyses were performed with the GraphPad Prism 6.0 or 9.2.0 software (GraphPad Inc., San Diego, CA), using the one-way analysis of variance (ANOVA) or Student's *t* test (unpaired). *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM/México (IN202418 and IN206321) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)/México (254531) to V.H.B. and from CONACYT/México (256263) to M.A.D.C. M.A.V.D. was supported by a predoctoral fellowship from CONACYT (594831).

The funders had no role in the study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

We thank M. Fernández-Mora and F. J. Santana for technical assistance, H. Salgado and I. Martínez-Flores for prediction of HiID-binding sites, M. M. Banda for constructing the Δ *siIE* mutant, and I. Martínez-Flores and D. Pérez-Morales for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Wang L, Wang FF, Qian W. 2011. Evolutionary rewiring and reprogramming of bacterial transcription regulation. *J Genet Genomics* 38:279–288. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2011.06.001>.
- Bustamante VH, Martínez LC, Santana FJ, Knodler LA, Steele-Mortimer O, Puente JL. 2008. HiID-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14591–14596. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801205105>.
- Fábrega A, Vila J. 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev* 26:308–341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>.
- Perez JC, Groisman EA. 2009. Evolution of transcriptional regulatory circuits in bacteria. *Cell* 138:233–244. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.002>.
- Ilyas B, Tsai CN, Coombes BK. 2017. Evolution of *Salmonella*-host cell interactions through a dynamic bacterial genome. *Front Cell Infect Microbiol* 7:428. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00428>.
- Fookes M, Schroeder GN, Langridge GC, Blondel CJ, Mammina C, Connor TR, Seth-Smith H, Vemikos GS, Robinson KS, Sanders M, Petty NK, Kingsley RA, Bäumlér AJ, Nuccio S-P, Contreras I, Santiviago CA, Maskell D, Barrow P, Humphrey T, Nastasi A, Roberts M, Frankel G, Parkhill J, Dougan G, Thomson NR. 2011. *Salmonella bongori* provides insights into the

- evolution of the *Salmonellae*. *PLoS Pathog* 7:e1002191. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002191>.
7. Lostroh CP, Lee CA. 2001. The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect* 3:1281–1291. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01488-5](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01488-5).
 8. Que F, Wu S, Huang R. 2013. *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) at work. *Curr Microbiol* 66:582–587. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0307-8>.
 9. Schechter LM, Lee CA. 2001. AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella typhimurium* *hilA* promoter. *Mol Microbiol* 40:1289–1299. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02462.x>.
 10. Martínez-Flores I, Pérez-Morales D, Sánchez-Pérez M, Paredes CC, Collado-Vides J, Salgado H, Bustamante VH. 2016. *In silico* clustering of *Salmonella* global gene expression data reveals novel genes co-regulated with the SPI-1 virulence genes through HilD. *Sci Rep* 6:37858. <https://doi.org/10.1038/srep37858>.
 11. Smith C, Stringer AM, Mao C, Palumbo MJ, Wade JT. 2016. Mapping the regulatory network for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion. *mBio* 7:e01024-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01024-16>.
 12. Colgan AM, Kröger C, Diard M, Hardt WD, Puente JL, Sivasankaran SK, Hokamp K, Hinton JCD. 2016. The impact of 18 ancestral and horizontally-acquired regulatory proteins upon the transcriptome and sRNA landscape of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS Genet* 12:e1006258-42. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006258>.
 13. Petrone BL, Stringer AM, Wade JT. 2014. Identification of HilD-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 196:1094–1101. <https://doi.org/10.1128/JB.01449-13>.
 14. Singer HM, Kühne C, Deditius JA, Hughes KT, Erhardt M. 2014. The *Salmonella* Spi1 virulence regulatory protein HilD directly activates transcription of the flagellar master operon *flhDC*. *J Bacteriol* 196:1448–1457. <https://doi.org/10.1128/JB.01438-13>.
 15. Mouslim C, Hughes KT. 2014. The effect of cell growth phase on the regulatory cross-talk between flagellar and Spi1 virulence gene expression. *PLoS Pathog* 10:e1003987. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003987>.
 16. Banda MM, Manzo R, Bustamante VH. 2019. HilD induces expression of a novel *Salmonella* Typhimurium invasion factor, YobH, through a regulatory cascade involving SprB. *Sci Rep* 9:12725. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49192-z>.
 17. Rivera-Chávez F, Winter SE, Lopez CA, Xavier MN, Winter MG, Nuccio SP, Russell JM, Laughlin RC, Lawhon SD, Stezenbach T, Bevins CL, Tsolis RM, Harshey R, Adams LG, Bäuml A. 2013. *Salmonella* uses energy taxis to benefit from intestinal inflammation. *PLoS Pathog* 9:e1003267. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003267>.
 18. Schmitt CK, Ikeda JS, Damell SC, Watson PR, Bispham J, Wallis TS, Weinstein DL, Metcalf ES, O'Brien AD. 2001. Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infect Immun* 69:5619–5625. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5619-5625.2001>.
 19. Stecher B, Hapfelmeier S, Müller C, Kremer M, Stallmach T, Hardt W-D. 2004. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun* 72:4138–4150. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.4138-4150.2004>.
 20. Horstmann JA, Lunelli M, Cazzola H, Heidemann J, Kühne C, Steffen P, Szeffs S, Rossi C, Lokareddy RK, Wang C, Lemaire L, Hughes KT, Utrecht C, Schlüter H, Grassl GA, Stradal TEB, Rossez Y, Kolbe M, Erhardt M. 2020. Methylation of *Salmonella* Typhimurium flagella promotes bacterial adhesion and host cell invasion. *Nat Commun* 11:2013. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15738-3>.
 21. Zhou L, Lei XH, Bochner BR, Wanner BL. 2003. Phenotype MicroArray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J Bacteriol* 185:4956–4972. <https://doi.org/10.1128/JB.185.16.4956-4972.2003>.
 22. Kazakov AE, Vassieva O, Gelfand MS, Osterman A, Overbeek R. 2003. Bioinformatics classification and functional analysis of PhoH homologs. *In Silico Biol* 3:3–15.
 23. Kim SK, Makino K, Aramemura M, Shinagawa H, Nakata A. 1998. Molecular analysis of the *phoH* gene, belonging to the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175:1316–1324. <https://doi.org/10.1128/jb.175.5.1316-1324.1993>.
 24. Santos-Beneit F. 2015. The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Front Microbiol* 6:402. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00402>.
 25. Kröger C, Colgan A, Srikumar S, Händler K, Sivasankaran SK, Hammatöf DL, Canals R, Grissom JE, Conway T, Hokamp K, Hinton JCD. 2013. An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Cell Host Microbe* 14:683–695. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.11.010>.
 26. Ramachandran VK, Shearer N, Thompson A. 2014. The primary transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its dependence on ppGpp during late stationary phase. *PLoS One* 9:e92690. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092690>.
 27. Olekhovich IN, Kadner RJ. 2007. Role of nucleoid-associated proteins Hha and H-NS in expression of *Salmonella enterica* activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion. *J Bacteriol* 189:6882–6890. <https://doi.org/10.1128/JB.00905-07>.
 28. Martínez LC, Banda MM, Fernández-Mora M, Santana FJ, Bustamante VH. 2014. HilD induces expression of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes by displacing the global negative regulator H-NS from *ssrAB*. *J Bacteriol* 196:3746–3755. <https://doi.org/10.1128/JB.01799-14>.
 29. Banda MM, Zavala-Alvarado C, Pérez-Morales D, Bustamante VH. 2019. SlyA and HilD counteract H-NS-mediated repression on the *ssrAB* virulence operon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and thus promote its activation by OmpR. *J Bacteriol* 201:e00530-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00530-18>.
 30. Romero-González LE, Pérez-Morales D, Cortés-Avalos D, Vázquez-Guerrero E, Paredes-Hernández DA, Estrada-De los Santos P, Villa-Tanaca L, de la Cruz MA, Bustamante VH, Antonio Ibarra J. 2020. The *Salmonella* Typhimurium InvF-SicA complex is necessary for the transcription of *sopB* in the absence of the repressor H-NS. *PLoS One* 15:e0240617-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240617>.
 31. Ali SS, Soo J, Rao C, Leung AS, Ngai DHM, Ensminger AW, Navarre WW. 2014. Silencing by H-NS potentiated the evolution of *Salmonella*. *PLoS Pathog* 10:e1004500. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004500>.
 32. Navarre WW, Porwollik S, Wang Y, McClelland M, Rosen H, Libby SJ, Fang FC. 2006. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* 313:236–238. <https://doi.org/10.1126/science.1128794>.
 33. Fang FC, Rimsky S. 2008. New insights into transcriptional regulation by H-NS. *Curr Opin Microbiol* 11:113–120. <https://doi.org/10.1016/j.cmb.2008.02.011>.
 34. Yang C, Huang TW, Wen SY, Chang CY, Tsai SF, Wu WF, Chang CH. 2012. Genome-wide PhoB binding and gene expression profiles reveal the hierarchical gene regulatory network of phosphate starvation in *Escherichia coli*. *PLoS One* 7:e47314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047314>.
 35. Winfield MD, Groisman EA. 2004. Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17162–17167. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406038101>.
 36. Osborne SE, Walther D, Tomljenovic AM, Mulder DT, Silphaduang U, Duong N, Lowden MJ, Wickham ME, Waller RF, Kenney LJ, Coombes BK. 2009. Pathogenic adaptation of intracellular bacteria by rewiring a cis-regulatory input function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3982–3987. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811669106>.
 37. Ilyas B, Mulder DT, Little DJ, Elhenawy W, Banda MM, Pérez-Morales D, Tsai CN, Chau NYE, Bustamante VH, Coombes BK. 2018. Regulatory evolution drives evasion of host inflammasomes by *Salmonella* Typhimurium. *Cell Rep* 25:825–832. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.078>.
 38. Choi J, Groisman EA. 2020. Horizontally acquired regulatory gene activates ancestral regulatory system to promote *Salmonella* virulence. *Nucleic Acids Res* 48:10832–10847. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa813>.
 39. Olekhovich IN, Kadner RJ. 2006. Crucial roles of both flanking sequences in silencing of the *hilA* promoter in *Salmonella enterica*. *J Mol Biol* 357:373–386. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.007>.
 40. Boddicker JD, Knosp BM, Jones BD. 2003. Transcription of the *Salmonella* invasion gene activator, *hilA*, requires HilD activation in the absence of negative regulators. *J Bacteriol* 185:525–533. <https://doi.org/10.1128/JB.185.2.525-533.2003>.
 41. Morgan E, Campbell JD, Rowe SC, Bispham J, Stevens MP, Bowen AJ, Barrow PA, Maskell DJ, Wallis TS. 2004. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 54:994–1010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04323.x>.
 42. Gerlach RG, Jäckel D, Stecher B, Wagner C, Lupas A, Hardt WD, Hensel M. 2007. *Salmonella* pathogenicity island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol* 9:1834–1850. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00919.x>.
 43. Jiang J, Yu K, Qi L, Liu Y, Cheng S, Wu M, Wang Z, Fu J, Liu X. 2018. A proteomic view of *Salmonella* Typhimurium in response to phosphate limitation. *Proteomes* 6:19. <https://doi.org/10.3390/proteomes6020019>.
 44. Spory A, Bosserhoff A, Von Rhein C, Goebel W, Ludwig A. 2002. Differential regulation of multiple proteins of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium by the transcriptional regulator SlyA. *J Bacteriol* 184:3549–3559. <https://doi.org/10.1128/JB.184.13.3549-3559.2002>.

45. Bingle LEH, Constantinidou C, Shaw RK, Islam MS, Patel M, Snyder LAS, Lee DJ, Penn CW, Busby SJW, Pallen MJ. 2014. Microarray analysis of the *ler* regulon in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains. *PLoS One* 9:e80160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080160>.
46. Bylino OV, Ibragimov AN, Shidlovskii YV. 2020. Evolution of regulated transcription. *Cells* 9:1675–1678. <https://doi.org/10.3390/cells9071675>.
47. Martínez LC, Yakhnin H, Camacho MI, Georgellis D, Babitzke P, Puente JL, Bustamante VH. 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 HII. *Mol Microbiol* 80:1637–1656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07674.x>.
48. Brosius J. 1984. Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene* 27: 151–160. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(84\)90136-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(84)90136-7).
49. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>.
50. Uzau S, Figueroa-Bossi N, Rubino S, Bossi L. 2001. Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15264–15269. <https://doi.org/10.1073/pnas.261348198>.
51. Choi KH, Gaynor JB, White KG, Lopez C, Bosio CM, Karkhoff-Schweizer RAR, Schweizer HP. 2005. A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat Methods* 2:443–448. <https://doi.org/10.1038/nmeth765>.
52. Puente JL, Bieber D, Ramer SW, Murray W, Schoolnik GK. 1996. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* 20:87–100. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02491.x>.
53. Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ. 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* 32:268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>.
54. Letunic I, Bork P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res* 49:W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>.
55. Medina-Rivera A, DeFrance M, Sand O, Hermann C, Castro-Mondragon JA, Delerce J, Jaeger S, Blanchet C, Vincens P, Caron C, Staines DM, Contreras-Moreira B, Artufel M, Charbonnier-Khamvongsa L, Hernandez C, Thieffry D, Thomas-Chollier M, Van Helden J. 2015. RSAT 2015: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* 43:W50–W56. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv362>.
56. Solovoyev V, Salamov A. 2011. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences, p 69–78. In Li RW (ed), *Metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies*. Nova Science Publishers, Hauppauge, NY.
57. Banda MM, López C, Manzo R, Rico-Pérez G, García P, Rosales-Reyes R, De la Cruz MA, Soncini FC, García-del Portillo F, Bustamante VH. 2018. HII and PhoP independently regulate the expression of *grhD1*, a novel gene required for *Salmonella* Typhimurium invasion of host cells. *Sci Rep* 8: 4841. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23068-0>.
58. Pérez-Morales D, Nava-Galeana J, Rosales-Reyes R, Teehan P, Yakhnin H, Melchy-Pérez EI, Rosenstein Y, De la Cruz MA, Babitzke P, Bustamante VH. 2021. An incoherent feedforward loop formed by SirA/BarA, HII and HII is involved in controlling the growth cost of virulence factor expression by *Salmonella* Typhimurium. *PLoS Pathog* 17:e1009630. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009630>.
59. Pérez-Morales D, Banda MM, Chau NYE, Salgado H, Martínez-Flores I, Ibarra JA, Ilyas B, Coombes BK, Bustamante VH. 2017. The transcriptional regulator SsrB is involved in a molecular switch controlling virulence lifestyles of *Salmonella*. *PLoS Pathog* 13:e1006497–27. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006497>.
60. Hoiseth SK, Stocker BA. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291:238–239. <https://doi.org/10.1038/291238a0>.
61. Ferenci T, Zhou Z, Betteridge T, Ren Y, Liu Y, Feng L, Reeves PR, Wang L. 2009. Genomic sequencing reveals regulatory mutations and recombinational events in the widely used MC4100 lineage of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 191:4025–4029. <https://doi.org/10.1128/JB.00118-09>.
62. Bustamante VH, Villalba MI, García-Angulo VA, Vázquez A, Martínez LC, Jiménez R, Puente JL. 2011. PerC and GrA independently regulate *ler* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 82:398–415. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07819.x>.
63. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* <https://doi.org/10.1038/msb4100050>.
64. Mayer MP. 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* 163:41–46. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00389-n](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00389-n).