
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**PAPEL DEL REGULADOR TRANSCRIPCIONAL SirA
EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LAS ISLAS DE
PATOGENICIDAD 1 Y 2 DE *Salmonella enterica* serovar
Typhimurium**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

MVZ LUARY C. MARTÍNEZ CHAVARRÍA

**ASESOR DE TESIS:
Dr. VÍCTOR H. BUSTAMANTE SANTILLÁN**

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos
Dr. Juan Miranda Ríos
Dr. Víctor H. Bustamante Santillán
Dr. José Luis Puente García

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Dra. Rosa Ma. Gutiérrez Ríos
Dra. Cinthia E. Núñez López
Dra. Bertha González Pedrajo
Dr. Juan Enrique Morett Sánchez
Dr. Víctor H. Bustamante Santillán

Durante el desarrollo de este trabajo recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 169380).

DEDICATORIA

A mi familia, ahora más grande, porque han respetado y apoyado siempre mi interés por crecer profesionalmente, a pesar de lo difícil que pueden ser a veces los problemas del “no estar”

A tí, quién si no?, una vez más, porque al estar dentro de mundos parecidos hemos sabido comprendernos, apoyarnos, regañarnos y amarnos, a distancia.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor y mejor amigo, el Dr. Víctor Bustamante, por ser un excelente asesor, capaz de transmitir conocimiento con paciencia y disciplina. Por su apoyo incondicional y por entenderme en esos momentos de duda y añoranza por las cosas que dejé. Y finalmente, por la amistad tan sólida y sincera que hemos establecido, sin la cual mi estancia en este lugar hubiera sido más difícil.

Al Dr. José Luis Puente, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y porque siempre tiene las palabras adecuadas para creer en uno mismo y no dejarse vencer en esos momentos difíciles, tanto académicos, como personales.

A mis compañeros del laboratorio, especialmente a nuestros técnicos laboratoristas, Elvira Villa y Patricia Jarillo, porque gracias a su trabajo y desempeño, los estudiantes podemos sacar adelante nuestros proyectos.

A los integrantes de mi comité tutorial, el Dr. Juan Miranda Ríos y el Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos, porque sus comentarios a lo largo de la realización de mi proyecto, fueron de gran ayuda para finalizarlo con éxito. Y porque más que miembros de mi comité tutorial, fueron mis amigos.

A los integrantes del jurado, Dra. Rosa Ma. Gutiérrez Ríos, Dra. Cinthia E. Núñez López, Dra. Bertha González Pedrajo y Dr. Juan Enrique Morett Sánchez, por las críticas y comentarios hacia mi trabajo.

A los amigos que encontré en Cuernavaca, con los que compartí bromas y estreses durante los cursos, Alberto, Alma, Karla G., Karla M., Arlette y Ericka. Sin su compañía, el inicio de mi maestría no hubiera sido tan agradable.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 9 |
| 1.INTRODUCCIÓN | 10 |
| • Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i> (SPI's) | 11 |
| • SPI-1 | 13 |
| • SPI-2 | 14 |
| • Sistemas de secreción tipo III (SSTT)..... | 19 |
| • Mecanismos moleculares en la patogénesis de <i>Salmonella</i> | 21 |
| • Regulación de los genes de SPI-1 y SPI-2 | 27 |
| • Regulación ambiental | 27 |
| • Reguladores positivos y negativos de los genes de SPI-1 | 29 |
| • Reguladores positivos y negativos de los genes de SPI-2 | 31 |
| 2. ANTECEDENTES | 34 |
| 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 38 |
| 4. METODOLOGÍA | 39 |
| • Construcción de plásmidos que expresan fusiones transcripcionales y plásmidos que expresan a SirA o HilD | 44 |
| • Ensayos de expresión de las fusiones transcripcionales al gen reportero <i>cat</i> | 47 |
| • “Western blot” para detectar la proteína SsrB y las proteínas etiquetadas con un epítipo FLAG o HA | 48 |
| • Perfil de secreción de proteínas | 49 |
| • Determinación de los índices de competencia (IC) de las cepas WT y $\Delta sirA$ de <i>S. typhimurium</i> | 49 |
| • Construcción de las cepas mutantes $\Delta sirA::km$, $\Delta uvrY::km$, $\Delta barA::km$ y $\Delta rtsA::km$ | 51 |
| • Etiquetado de los genes <i>sirA</i> , <i>hilD</i> , <i>invF</i> , <i>hilA</i> y <i>rtsA</i> con el epítipo FLAG o HA | 53 |
| • Eliminación del cassette de resistencia a kanamicina de las mutantes construidas y de las cepas etiquetadas con los epítopos FLAG o HA | 54 |
| 5. RESULTADOS | 55 |
| • Construcción de cepas mutantes y plásmidos recombinantes | 55 |
| • SirA y HilD se requieren para la expresión de <i>hilA</i> | 55 |
| • HilD regula directamente la expresión de <i>hilA</i> , mientras que el efecto de SirA sobre la expresión de <i>hilA</i> es en cascada, al regular positivamente la expresión de <i>hilD</i> | 57 |
| • HilD no requiere de otro regulador de <i>Salmonella</i> para inducir la expresión de <i>hilA</i> | 61 |
| • SirA modula positivamente la expresión de <i>hilD</i> | 62 |
| • SirA requiere de su proteína cinasa BarA para regular la expresión de los genes de SPI-1 | 65 |
| • SirA regula positivamente la expresión de <i>hilC</i> y <i>rtsA</i> , a través de la regulación de <i>hilD</i> .. | 67 |

| | |
|--|-----------|
| • La cascada de regulación formada por SirA y HilD se requiere para la expresión de los genes de SPI-2 | 71 |
| • SirA no se requiere para la enfermedad sistémica producida por <i>S. Typhimurium</i> en el ratón | 73 |
| | |
| 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES | 78 |
| | |
| 7. PERSPECTIVAS | 83 |
| | |
| 8. APÉNDICE | 90 |
| • Preparación de geles de agarosa | 90 |
| • Purificación de ADN utilizando el kit “Gene clean” de Bio101 | 90 |
| • Precipitación de ADN con butanol | 90 |
| • Precipitación de ADN plasmídico con glicógeno | 91 |
| • | |
| • Purificación de plásmidos por miniprep | 91 |
| • Purificación de plásmidos utilizando el kit “High Pure Plasmid Isolation Kit” de Qiagen ... | 92 |
| • Purificación de PCR’s y digestiones utilizando el kit “PCR Purification Kit” de Qiagen | 92 |
| • Preparación de células competentes para electroporación | 93 |
| • Electroporación | 93 |
| • Preparación de geles de poliacrilamida | 94 |
| • Buffer de transferencia | 94 |
| • Buffer PBS 10X..... | 94 |
| • Buffer PBS-T | 95 |
| • Solución bloqueadora | 95 |
| • Solución de lavado TDTT | 95 |
| • Buffer SDS-PAGE | 95 |
| | |
| 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 96 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 1. | Mapa de SPI-1 | 14 |
| Figura 2. | Mapa de SPI-2 | 15 |
| Figura 3. | Modelo de los SSTT codificados en SPI-1 y SPI-2 | 20 |
| Figura 4. | Modelo de los eventos involucrados en la patogénesis de <i>Salmonella</i> | 23 |
| Figura 5. | Modelo de la regulación de genes de la SPI-1 y SPI-2 de <i>Salmonella</i> | 33 |
| Figura 6. | Los genes de SPI-1 y SPI-2 se expresan en diferentes etapas de crecimiento en el medio LB..... | 36 |
| Figura 7. | SirA y HilD están involucrados en la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 en medio LB | 37 |
| Figura 8. | Modelo que explica la posible regulación de SirA y HilD sobre los reguladores principales de SPI-1 y SPI-2, HilA y SsrB | 37 |
| Figura 9. | Representación esquemática de las fusiones transcripcionales de los genes <i>hila</i> , <i>hilC</i> , <i>hilD</i> y <i>sirA</i> al gen reportero <i>cat</i> | 46 |
| Figura 10. | SirA y HilD son requeridos para la expresión de <i>hila</i> | 56 |
| Figura 11. | HilD puede inducir directamente la expresión de <i>hila</i> en ausencia de SirA | 58 |
| Figura 12. | Inmunodetección de HilA-FLAG | 59 |
| Figura 13. | HilD es capaz de restaurar la expresión y secreción de proteínas codificadas por SPI-1 en una mutante <i>sirA</i> de <i>S. Typhimurium</i> | 60 |
| Figura 14. | HilD no requiere de SirA para inducir la expresión de <i>hila</i> en <i>E. coli</i> | 61 |
| Figura 15. | SirA se requiere para la expresión óptima de HilD | 63 |
| Figura 16. | La proteína HilD-FLAG no puede ser detectada con anticuerpos anti-FLAG..... | 64 |
| Figura 17. | El perfil de secreción proteica afectado en la cepa que contiene la proteína HIID-FLAG se restaura en presencia del plásmido que expresa HilD | 64 |
| Figura 18. | La proteína HilD-FLAG no puede ser inmunodetectada en presencia del plásmido que expresa HilD | 65 |
| Figura 19. | SirA necesita de BarA para inducir la expresión de <i>hila</i> | 66 |
| Figura 20. | SirA necesita de BarA para inducir la expresión de <i>hilC</i> | 66 |
| Figura 21. | SirA y HilD están involucrados en la expresión de <i>hilC</i> | 68 |
| Figura 22. | SirA y HilD controlan la expresión de <i>rtsA</i> | 68 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 23. SirA y HilD están involucrados en la expresión de <i>hilD</i> | 69 |
| Figura 24. HilD induce directamente la expresión de la fusión <i>hilC-cat</i> en <i>E. coli</i> | 70 |
| Figura 25. HilD induce directamente la expresión de la fusión <i>rtsA-cat</i> en <i>E. coli</i> | 70 |
| Figura 26. HilD es capaz de inducir su propia expresión en <i>E. coli</i> | 71 |
| Figura 27. SirA, HilD y OmpR son requeridos para la expresión de SsrB en medio LB | 72 |
| Figura 28. La cascada de regulación conformada por SirA y HilD, controla la expresión de SsrB | 73 |
| Figura 29. La mutante en <i>sirA</i> no está atenuada cuando se inocula por vía oral a ratones .. | 74 |
| Figura 30. La mutante en <i>sirA</i> está muy poco atenuada cuando se inocula por vía intraperitoneal a ratones | 75 |
| Figura 31. Modelo para la regulación de <i>hilA</i> (SPI-1) y <i>ssrB</i> (SPI-2) | 84 |
| Figura 32. Modelo para la regulación de SPI-2 | 87 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1. Características de las SPI's | 12 |
| Tabla 2. Proteínas sustrato de los SSTT codificados en SPI-1 y SPI-2 | 16 |
| Tabla 3. Cepas bacterianas y plásmidos empleados en este trabajo | 39 |
| Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en este trabajo | 41 |
| Tabla 5. Antibióticos y dosis empleadas en este trabajo | 44 |
| Tabla 6. Índices de competitividad obtenidos con la inoculación de las cepas $\Delta sirA::km/silvestre$, $\Delta ssrB::km/silvestre$ y $\Delta ssrB::km/\Delta sirA::tet$ por vía oral | 74 |
| Tabla 7. Índices de competitividad obtenidos con la inoculación de las cepas $\Delta sirA::km/silvestre$, $\Delta ssrB::km/silvestre$ y $\Delta sirA::Tet/\Delta ssrB::km$ por vía intraperitoneal ... | 75 |

RESUMEN

Las infecciones por *Salmonella* pueden ocasionar dos entidades clínicas en humanos: fiebre tifoidea y gastroenteritis. Muchos de los genes necesarios para la virulencia de *Salmonella* están codificados en regiones particulares del genoma conocidas como islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI, de *Salmonella Pathogenicity Islands*). Las SPI más estudiadas son la SPI-1 y la SPI-2; ambas codifican sistemas de secreción tipo tres (SSTT) y diferentes proteínas efectoras y chaperonas esenciales en diferentes etapas de la infección, así como proteínas involucradas en la regulación de la expresión de los genes de cada isla. Los genes de SPI-1 se requieren para la invasión de *Salmonella* a las células epiteliales. Mientras que los genes de SPI-2 se requieren para su multiplicación y sobrevivencia dentro de macrófagos, pero también se necesitan para la infección intestinal completa.

HilD, HilA e InvF son reguladores transcripcionales codificados en SPI-1 que se requieren para la expresión de los genes de esta isla. Mientras que el sistema de dos componentes SsrA/SsrB, codificado en SPI-2, controla positivamente los genes de SPI-2. Fuera de las SPIs se encuentra codificado el sistema de dos componentes SirA/BarA, el cual regula positivamente la expresión del regulador HilA, aunque no es claro su mecanismo de acción. Además, en nuestro grupo de investigación hemos encontrado que, bajo condiciones específicas de crecimiento, SirA se requiere para la expresión de genes de SPI-2. Mediante el análisis de la expresión de fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, del análisis de proteínas secretadas, así como de experimentos de inmunodetección tipo “Western blot”, determinamos que existe una regulación en cascada en la que SirA regula la expresión de HilD y éste, a su vez, induce la expresión de HilA y SsrB, los reguladores centrales de los genes de SPI-1 y SPI-2, respectivamente. Además, HilD también induce la expresión de los reguladores HilC, codificado en SPI-1, y RtsA, codificado fuera de las SPIs, cuyo papel aún no es claro. Nuestros resultados indican que SirA se requiere solamente para la expresión óptima de HilD, actuando de esta manera como un modulador positivo. Así mismo, indican que SirA necesita de BarA para ejercer su papel como regulador positivo de la expresión de HilD y, como consecuencia, de la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2. Por otro lado, mediante ensayos de competencia en ratón, determinamos que la cascada de regulación conformada por SirA y HilD no es esencial para que *Salmonella* cause infección sistémica en este modelo animal. Nosotros proponemos que SirA y HilD inducen la expresión de los genes de SPI-2 cuando *Salmonella* se encuentra en el lumen del intestino, antes de la invasión al epitelio intestinal, lo cual es consistente con estudios recientes que han reportado que los genes de SPI-2 también son necesarios en las primeras etapas de la infección por *Salmonella*. Alternativamente, el control de la expresión de SPI-2 por la cascada SirA-HilD podría ser necesario para causar enfermedad en otros hospederos.

Nuestros resultados aportan evidencias novedosas que revelan la comunicación a nivel transcripcional entre las dos islas de patogenicidad más importantes de *Salmonella* y ayudarán a entender el papel de la cascada de regulación que conforman SirA y HilD durante la transición de *Salmonella* de ser un patógeno extracelular a ser un patógeno intracelular.

1. INTRODUCCIÓN

La salmonelosis comprende varias infecciones intestinales causadas por bacterias del género *Salmonella*. Este género comprende dos especies: *Salmonella enterica*, con gran número de serotipos importantes clínicamente y *Salmonella bongori*, especie filogenéticamente más antigua raramente asociada con patologías humanas. *S. enterica* se encuentra dividida en 6 subespecies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*). Cada subespecie a su vez está dividida en serotipos de acuerdo a la clasificación de Kauffman-White, la cual se basa en antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (Vi). Se han descrito hasta la fecha 2501 serotipos de *Salmonella*, que se han clasificado de acuerdo con su adaptación en hospederos animales (OMS, 2005).

Las infecciones por *Salmonella* pueden ocasionar dos entidades clínicas en humanos:

- Fiebre entérica, que incluye la fiebre tifoidea, causada por *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) y la fiebre paratifoidea causada por *S. enterica* serovar Paratyphi A, B o C (*S. Paratyphi*). En la fiebre entérica se desarrolla una infección sistémica, lo que quiere decir que la bacteria es capaz de diseminarse en el organismo y llegar a órganos como el hígado o el bazo. Los síntomas y signos que se presentan son escalofríos, fiebre prolongada, cefalea, náuseas, anorexia, tos y diarrea o estreñimiento. Entre un 20-40% presentan dolor abdominal. En ocasiones también se produce hepatoesplenomegalia, espistaxis, bradicardia e incluso delirios
- Gastroenteritis (salmonelosis no tifoidea), la cual es la más común de las infecciones y es causada por varios serotipos (García-del Portillo, 2001; Levine *et al.*, 2001). En México, los serotipos aislados más frecuentemente como causa de gastroenteritis son *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) y *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000). Este tipo de infecciones no involucran una infección sistémica. El signo más representativo es la diarrea, aunque también cursa con fiebre no prolongada, vómitos y náuseas. La gastroenteritis es una enfermedad autolimitante.

Dependiendo del hospedador y el serotipo bacteriano, la ingestión de *Salmonella* puede originar la enfermedad gastroentérica o la fiebre tifoidea.

Aunque la incidencia de la fiebre tifoidea ha disminuido en los últimos años, las patologías causadas por *Salmonella* representan aún un grave problema mundial de salud, tanto en salud pública como en salud animal, debido al impacto económico que ocasionan. La OMS reporta que anualmente existen 16.6 millones de casos de fiebre tifoidea, con casi 600 000 muertes, y 1.3 billones de casos de gastroenteritis y diarreas debidas a salmonelosis no tifoideas, que producen 3 millones de muertes anuales, siendo éstas últimas las infecciones de origen alimentario más comunes a nivel mundial (Pang *et al.*, 1995). En nuestro país, tan sólo el año pasado (2006) se reportaron 36,568 casos de fiebre tifoidea y 110,582 casos de salmonelosis no tifoideas, siendo los estados de Chiapas, Coahuila, Sinaloa, Tabasco y Tamaulipas, los de mayor número de casos reportados (SUIVE, 2007).

- **Islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI's)**

La gravedad de una infección por *Salmonella* depende del tipo y del estado inmunológico del hospedador, así como de la virulencia de la bacteria. Esto último lo determinan los llamados factores de virulencia, que incluyen toxinas, adhesinas, sistemas de secreción y proteínas efectoras.

Se ha estimado que aproximadamente el 4% del genoma de *S. Typhimurium* se requiere para la infección en el ratón, lo cual se traduce en más de 200 genes para la virulencia (Bowe *et al.*, 1998). La necesidad de tener muchos determinantes para la virulencia refleja las complejas interacciones que establece *Salmonella* con la célula hospedadora. La sobrevivencia de la bacteria en el hospedador resulta de un riguroso control de la expresión de muchos genes que actúan en el momento y lugar adecuados.

Muchos de los genes necesarios para la virulencia de *Salmonella* están codificados en regiones particulares del genoma conocidas como islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI, de *Salmonella Pathogenicity Islands*) (Marcus *et al.*, 2000).

En general, las islas de patogenicidad (PI, de *Pathogenicity Islands*) pueden encontrarse en patógenos tanto de humanos, como de plantas y animales (Hacker y Kaper., 2000; Groisman y Ochman, 1996). Estas islas pueden ser reconocidas debido a que presentan las siguientes características:

- Contienen genes que codifican factores de virulencia.
- Están presentes en los genomas de organismos patógenos pero ausentes en aquellos no patógenos de la misma especie o de especies relacionadas.
- Ocupan regiones del genoma relativamente grandes; la mayoría abarca regiones de ADN desde 10 a 200 kb. Regiones más pequeñas que también codifican factores de virulencia, son llamadas islotes.
- Difieren del resto del genoma en su contenido de C+G y en el uso de codones, lo que refleja su probable adquisición mediante transferencia génica horizontal. Para el caso específico de *Salmonella*, las SPI's tienen un contenido de GC bajo (entre 37% y 47%) en relación al resto del genoma (52%) (Marcus *et al.*, 2000).
- Se encuentran flanqueadas por secuencias pequeñas repetidas directas (DR), que pudieron haberse generado después de la integración de regiones específicas de las PI en el genoma hospedador mediante recombinación.
- Frecuentemente están asociadas con genes de ARN de transferencia (ARNt), lo que también refleja su adquisición vía transferencia horizontal puesto que éstos actúan como sitios de integración de ADN extraño.
- Llevan genes funcionales o crípticos que codifican factores de movilidad, tales como integrasas y transposasas, así como elementos de secuencias de inserción.

Los genes presentes en las SPI tienen un papel crucial dentro de la patogénesis de las infecciones causadas por *Salmonella*, ya que contribuyen a la invasión de las células del hospedador y a la patogénesis intracelular del microorganismo.

Hasta ahora se han reportado 10 SPI's; algunas se conservan entre los miembros del género *Salmonella*, mientras que otras son específicas de ciertos serotipos (Hensel,

2004). Además, existen otras regiones cromosomales con características de islas, pero sin una función clara en la patogénesis de *Salmonella* (Tabla 1).

Tabla 1. Características de las SPI's

| Designación | Tamaño en kb | %G+C | Punto de inserción | Distribución | Variabilidad (estabilidad) | Funciones de virulencia |
|--------------------------|--------------|------|--------------------|-------------------------|----------------------------|--|
| SPI-1 | 39.8 | 47 | <i>flh-mutS</i> | <i>Salmonella</i> spp. | Conservada | SSTT*, consumo de Fe, Invasión a células epiteliales |
| SPI-2 | 39.7 | 44.6 | tARN <i>valV</i> | <i>S. enterica</i> | Conservada | SSTT, sobrevivencia y replicación intracelular |
| SPI-3 | 17.3 | 47.3 | tARN <i>selC</i> | <i>Salmonella</i> spp. | Variable | Consumo de Mg ²⁺ |
| SPI-4 | 23.4 | 44.8 | tARN like | <i>Salmonella</i> spp. | Conservada | Desconocido |
| SPI-5 | 7.6 | 43.6 | tARN <i>serT</i> | <i>Salmonella</i> spp. | Variable | Efectores de SSTT |
| SPI-6 (SCI) ^a | 59 | 51.5 | tARN <i>aspV</i> | Subsp. I, IIIb, IV, VII | ¿? | Fimbria |
| SPI-7 (MPI) ^b | 133 | 49.7 | tARN <i>pheU</i> | Serotipos de subsp. I | Inestable | Antígeno Vi, pili, <i>sopE</i> |
| SPI-8 | 6.8 | 38.1 | tARN <i>pheV</i> | Serovar Typhi | ¿? | Desconocido |
| SPI-9 | 16.3 | 56.7 | Profago | Serotipos de subsp. I | ¿? | Toxina putativa |
| SPI-10 | 32.8 | 46.6 | tARN <i>leuX</i> | Serotipos de subsp. I | ¿? | Fimbria Sef |
| SGI-1 ^c | 43 | 48.4 | <i>thdF-yidY</i> | Serotipos de subsp. I | Variable | 5 genes de resistencia a antibióticos |
| HPI ^d | ¿? | ¿? | tARN <i>asnT</i> | Subsp. IIIa, IIIb, IV | ¿? | Consumo de Fe de alta afinidad |

^a *Salmonella* chromosomal island

^b Major pathogenicity island

^c *Salmonella* genomic island

^d High pathogenicity island

* Sistema de secreción tipo 3

SPI-1 y SPI-2 son las SPI más estudiadas en *Salmonella*; ambas codifican un sistema de secreción tipo tres (SSTT) (Hansen-Wester y Hensel, 2001), así como muchas de las diferentes proteínas efectoras y chaperonas que son esenciales en diferentes etapas de la infección y que son translocadas hacia la célula hospedadora mediante el SSTT codificado en cada SPI.

SPI-1

SPI-1 se encuentra localizada en el centisoma 63 de *S. Typhimurium*, insertada entre los genes *fhlA* y *mutS*. Comprende aproximadamente 40 kb, y contiene al menos 39 genes (Ochman y Groisman, 1996) (Fig. 1), que pueden ser divididos en categorías funcionales que incluyen: genes que codifican los componentes del SSTT, genes que codifican proteínas involucradas en la regulación de la expresión de los genes de la isla, y genes que codifican las proteínas efectoras y sus chaperonas.

Esta isla se encuentra presente en *S. bongori* y todas las serovariedades de *S. enterica*; probablemente fue adquirida en la evolución temprana de *S. enterica*. Se ha reportado que algunos genes de esta isla son parecidos en tamaño, ordenamiento y orientación, a los genes de invasión del plásmido de virulencia de *Shigella* (Miroid *et al.*, 2001).

La contribución de SPI-1 a la virulencia de *Salmonella* depende de la habilidad de su SSTT para translocar proteínas efectoras en el citosol de las células hospedadoras (Marcus *et al.*, 2000; Zhou y Galán, 2001).

El SSTT de esta isla está codificado por los loci *inv/spa*, *prg*, *org* y *sip*. El inyectisoma del SSTT codificado en esta isla consiste de un par de anillos basales compuestos de las proteínas PrgK, PrgH e InvG y de una estructura tipo aguja formada por la proteína PrgI.

Se han identificado al menos 13 proteínas efectoras: AvrA, SipABCD, SlrP, SopA, SopB, SopD, SopE, SopE2, SptP y SspH (Lostroh y Lee, 2001b). Estas proteínas modifican diferentes rutas de transducción de señales en las células hospedadoras, lo que favorece la invasión de la bacteria a las células epiteliales del hospedero; sin embargo, el mecanismo de acción de algunas de ellas no es claro, o no ha sido elucidado aún.

En la tabla 2 se muestran las características de algunas proteínas efectoras que son translocadas mediante el SSTT codificado en SPI-1.

SPI 1

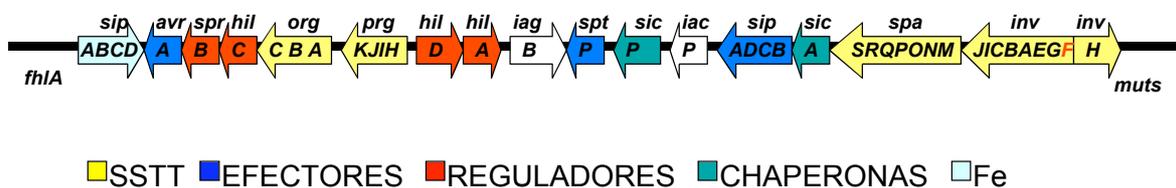


Fig. 1 Mapa de SPI-1. Las flechas indican el sentido de la transcripción de cada gen o grupo de genes.

SPI-2

La SPI-2 se localiza en el centisoma 31, insertada entre los genes tRNA *valV* y ORF242; abarca 40 kb y contiene 44 genes. Ésta se ha dividido en dos segmentos, los cuales se estima fueron obtenidos en diferentes eventos de transferencia horizontal (Hensel *et al.*, 1999a) (Fig. 2). El fragmento pequeño, de 14.5 kb, está presente en *S. bongori* y *S. enterica*; contiene 7 genes cuya función se desconoce y 5 genes *ttr* que codifican una tetraciónato reductasa y el sistema de dos componentes que regula la expresión de ésta. Esto capacita a la bacteria para utilizar componentes sulfurados, como el tetraciónato, como aceptores de electrones para la respiración bajo condiciones anaeróbicas (Hensel, 2000); sin embargo estos genes no son esenciales para la virulencia (Hensel *et al.*, 1999b). El otro fragmento, de 25.3 kb, contiene los genes necesarios para la virulencia del microorganismo y está presente sólo en *S. enterica* (Hansen-Wester y Hensel, 2001).

Estos genes se encuentran organizados en al menos 4 grupos: *ssa* (secretion system apparatus), *ssr* (secretion system regulator), *ssc* (secretion system chaperone) y *sse* (secretion system effector) (Marcus *et al.*, 2000).

El primero incluye los genes que codifican los componentes estructurales del SSTT, *ssaBCDEGHIJKLMVN-U* (Cirillo *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 1998). Los genes *sse* y *ssc* se transcriben como un solo operón de 9 genes; en el grupo *sse* se encuentran los genes que codifican las proteínas efectoras del sistema, *sseA-G*. El grupo *ssc* codifica las proteínas chaperonas del SSTT, SscA y SscB, las cuales tienen homología con la familia LcrH/IppI/SicA de chaperonas de secreción tipo tres (Marcus *et al.*, 2000). El operón *ssr* está constituido por *ssrA* y *ssrB*, que codifican un sistema regulador de dos componentes, requerido para la expresión de los genes *sse*, *ssa* y *ssc* (Hensel, 2000).

Al igual que SPI-1, la contribución de SPI-2 a la virulencia de *Salmonella* se debe a que a través del SSTT codificado en esta isla se secretan varias proteínas efectoras (Hansen-Wester y Hensel, 2001), lo cual es necesario para que esta bacteria se pueda replicar dentro

de los macrófagos de su hospedero. En la tabla dos se indican las características de algunas proteínas efectoras que son translocadas vía el SSTT de la SPI-2.

SPI-2

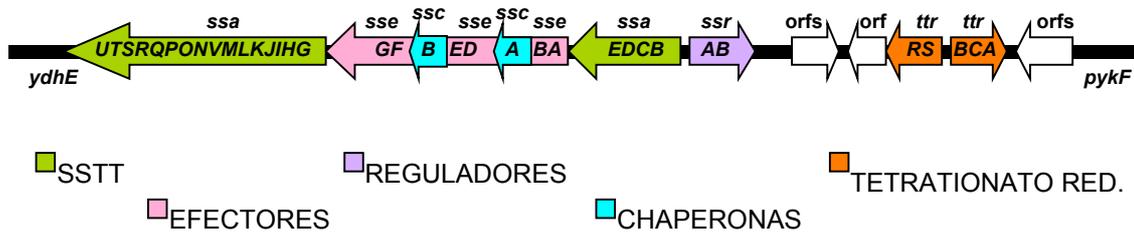


Fig. 2 Mapa de SPI-2. Los genes en color blanco y naranja constituyen el fragmento pequeño de 14.5 Kb, mientras que el resto conforman el fragmento que contiene los genes importantes para la virulencia de *Salmonella*. Las flechas indican el sentido de la transcripción de cada gen o grupo de genes.

**Tabla 2. Proteínas sustrato de los SSTT codificados en SPI-1 y SPI-2
EFECTORES SECRETADOS VÍA EL SSTT DE LA SPI-1**

| Proteína | LEC | Actividad bioquímica y/o función conocida <i>in vivo</i> | Comentarios | Referencias |
|--|------------|---|---|--|
| AvrA “avirulence factor A” | SPI-1 | proteína antiinflamatoria estimula la apoptosis en las células epiteliales | Homología con YopJ de <i>Yersinia</i> y AvrXv de <i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> , un patógeno de plantas. | Collier-Hyams <i>et al.</i> , 2002 Marcus <i>et al.</i> , 2000 Hardt y Galán, 1997 |
| SipA “ <i>Salmonella</i> invasion protein” | SPI-1 | Se une a actina y la estabiliza inhibiendo su despolimerización; migración de granulocitos PMN | Su chaperona es SicA | Hansen-Wester y Hensel, 2001 Lee <i>et al.</i> , 2000b Zhang <i>et al.</i> , 2002 Zhou <i>et al.</i> , 1999a Zhou <i>et al.</i> , 1999b Zhou y Galán, 2001 |
| SipB “ <i>Salmonella</i> invasion protein” | SPI-1 | Unión y activación de caspasa-1. Translocación de efectoras de SPI-1. Responsable de formar poros en la membrana de la célula hospedadora. | | Hersh <i>et al.</i> , 1999 Santos <i>et al.</i> , 2001 |
| SipC “ <i>Salmonella</i> invasion protein” | SPI-1 | Inducción de apoptosis en macrófagos Polimerización de actina. Responsable de formar poros en la membrana de la célula hospedadora. | Comparten un dominio hidrofóbico presente en la familia RTX (toxina formadora de poro) | Zhou y Galán, 2001 Hersh <i>et al.</i> , 1999 Hayward <i>et al.</i> , 1999 |
| SipD “ <i>Salmonella</i> invasion protein” | SPI-1 | Translocación de efectoras de SPI-1. Translocación de efectoras de SPI-1. Responsable de formar poros en la membrana de la célula hospedadora. | | Collazo y Galán, 1997 |
| SopA “ <i>Salmonella</i> outer protein” | SPI-1 | Inducción de enteritis | | Wood <i>et al.</i> , 2000 Zhang <i>et al.</i> , 2002 Lee <i>et al.</i> , 2000b |
| SopB “ <i>Salmonella</i> outer protein” en <i>S.</i> Dublin | SPI-5 | Inositol fosfato fosfatasa. | | Feng <i>et al.</i> , 2001 Galyov <i>et al.</i> , 1997 Wood <i>et al.</i> , 1998 |
| SigD “ <i>Salmonella</i> | | Activación de fosfolipasa C. | | Norris <i>et al.</i> , 1998 |

| | | | | |
|---|----------------------|---|--|---|
| invasion genes” en <i>S. Typhimurium</i> | | Inhíbe la exportación de RNA mensajero nuclear. Afecta homeostasis de cloro. Polimerización de actina | | Zhou <i>et al.</i> , 2001 |
| SopD “ <i>Salmonella</i> outer protein” | SPI-1 | Inducción de enteritis | | Jones <i>et al.</i> , 1998 Zhang <i>et al.</i> , 2002 |
| InvJ | SPI-1 | Translocación de proteínas efectoras GEF, activa las GTPasas Cdc42 y Rac | | |
| SopE “ <i>Salmonella</i> outer protein” | profago centisoma 61 | Polimerización de actina, producción de citocinas GEF; activa GTPasa Cdc42 | comparten 70% de identidad | Friebel <i>et al.</i> , 2001 Hardt <i>et al.</i> , 1998 Bakshi <i>et al.</i> , 2000 Stender <i>et al.</i> , 2000 Zhang <i>et al.</i> , 2002 |
| SopE2 “ <i>Salmonella</i> outer protein” | SPI-1 | Polimerización de actina GAP | | |
| SptP “ <i>Salmonella</i> protein tirosin phosphatase” | SPI-1 | Tirosina fosfatasa; citotoxina Reordenación de los rearrreglos del citoesqueleto de actina | Similar a YopE (región amino terminal) y YopH (región carboxilo terminal) de <i>Yersinia</i> | Kaniga <i>et al.</i> , 1996 Fu y Galán, 1999 Fu y Galán, 1998 |

EFFECTORES SECRETADOS VÍA EL SSTT DE LA SPI-2

| Proteína | LEC | Actividad bioquímica y/o función conocida in vivo | Comentarios | Referencias |
|--|-------|---|--|--|
| SsaB (SpiC) “secretion system apparatus” | SPI-2 | Inhíbe fusión de SCV's con lisosomas y endosomas. Inducción de IL-10. Translocación de otras efectoras. | | Uchiya <i>et al.</i> , 1999 Freeman <i>et al.</i> , 2002 Kuhle y Hensel, 2004 |
| SseB “secretion system effector” | SPI-2 | Translocador de efectoras | Homólogo de EspA de EPEC, una proteína involucrada en la formación de un filamento de superficie | Vázquez-Torres <i>et al.</i> , 2000 Knutton <i>et al.</i> , 1998 Waterman y Holden, 2003 |
| SseC “secretion system | SPI-2 | Translocador; Inserción en la | Homólogo de YopB de | Klein y Jones, 2001 |

| | | | | |
|--|-----------------|--|--|---|
| effector” | | membrana de células blanco | <i>Yersinia</i> , que es una proteína formadora de poro | |
| SseD “secretion system effector” | SPI-2 | Translocador | Homólogo of EspB de EPEC | Klein y Jones, 2001 |
| SspH1** | Profago Gipsy-3 | Función en las infecciones gastrointestinales de <i>S. Typhimurium</i> en el modelo bovino | Comparten 69% de identidad, contienen secuencias repetidas ricas en leucina y presentan similitud con las efectoras IpaH de <i>Shigella flexneri</i> y YopM de <i>Yersinia</i> , respectivamente | Waterman y Holden, 2003 Miao <i>et al.</i> , 1999 Kuhle y Hensel, 2004 Miao <i>et al.</i> , 2003 |
| SspH2 | fago | Inhibe polimerización de actina. Función en las infecciones gastrointestinales de <i>S. Typhimurium</i> en el modelo bovino | | |
| SseF “secretion system effector” | SPI-2 | Formación de Sif’s. Empaquetamiento de microtúbulos | | Kuhle y Hensel, 2004 Kuhle y Hensel., 2002 |
| SseG “secretion system effector” | SPI-2 | Formación de Sif’s. Empaquetamiento de microtúbulos | | Cirillo <i>et al.</i> , 1998 Hensel <i>et al.</i> , 1998 |
| SifA “ <i>Salmonella</i> -induced filaments” | islote | Formación de Sif’s. Integridad de SCV’s | | Beuzón <i>et al.</i> , 2000 Kuhle y Hensel, 2004 Brumell <i>et al.</i> , 2002 Freeman <i>et al.</i> , 2003 |
| SifB “ <i>Salmonella</i> -induced filaments” | islote | ¿? | 30% de identidad con SifA | Waterman y Holden, 2003 Guiney y Lesnick, 2005 |
| SseI “secretion system effector” | Profago Gipsy-2 | Integridad de SCV’s. ¿? | Se localiza en sitios donde polimeriza el citoesqueleto de actina (después de la translocación) | Waterman y Holden, 2003 Kuhle y Hensel, 2004 Miao <i>et al.</i> , 2003 |
| SseJ “secretion system effector” | fago | Modifica los lípidos de membrana de las SCV’s para facilitar la replicación y división celular ¿? | Similitud con enzimas lipolíticas | Freeman <i>et al.</i> , 2003 Waterman y Holden, 2003 |
| SopD2 “ <i>Salmonella</i> outer protein” | islote | Formación de Sif’s. Importante en virulencia en ratones | 42% de identidad con SopD | Kuhle y Hensel, 2004 Brumell <i>et al.</i> , 2003 Waterman y Holden, 2003 Guiney y Lesnick, 2005 |
| SlrP ** | Islote | Factor de adaptación a | Homología con IpaH de <i>Shigella</i> | Tsolis <i>et al.</i> , 1999 |

| | | | | |
|--------------|-------|-----------|---|------------------------------|
| | | hospedero | <i>flexneri</i> y YopM de <i>Yersinia pestis</i> . | |
| PipB | SPI-5 | ¿? | Presente en MRD | Guiney y Lesnick, 2005 |
| PipB2 | ¿? | ¿? | Presente en MRD | Knodler <i>et al.</i> , 2003 |

LEC: localización en el cromosoma; PMN: polimorfonucleares; GEF: guanine exchange factor; GAP: GTPase activating protein; SCV: *Salmonella* containing vacuole; Sif: *Salmonella*-induced filament; MRD: microdominios resistentes a detergentes; ¿? Desconocido o no muy claro. **También es translocado vía el SSTT de SPI-1

- **Sistemas de secreción tipo III (SSTT)**

Los SSTT complejos organelos compuestos por más de 20 proteínas. Algunas de estas proteínas están organizadas formando parte de una estructura supramolecular conocida como el complejo de aguja o inyectorisoma. Este aparato atraviesa las membranas bacterianas interna y externa y está constituido a base de proteínas que se ensamblan en un proceso altamente regulado.

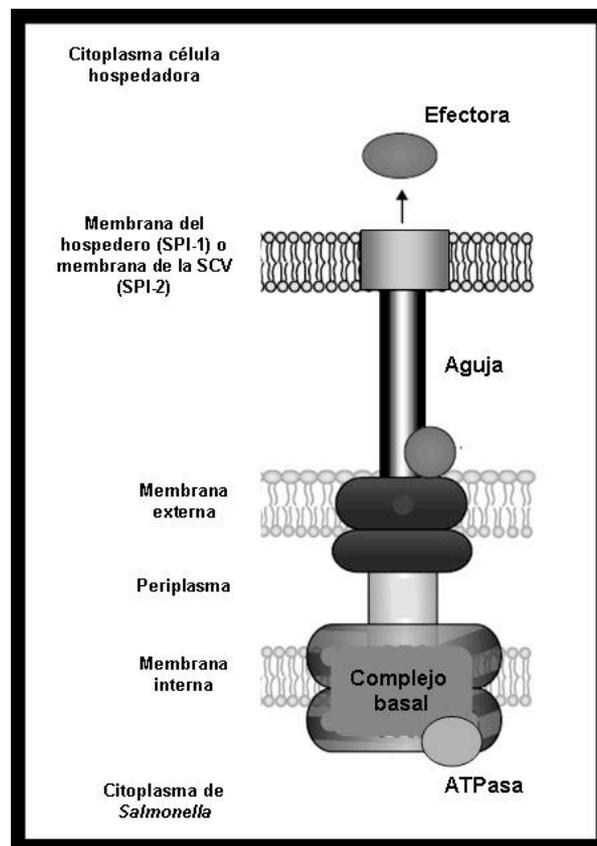


Figura 3. Modelo de los SSTT codificados en SPI-1 y SPI-2

El ensamblado de estas estructuras ocurre de manera secuencial y ordenada. Como primer paso, aquellas proteínas destinadas a formar la base del complejo son secretadas a través de la membrana bacteriana interna por un mecanismo sec-dependiente. Una vez en el periplasma, estas proteínas forman un complejo que se asocia con proteínas de la membrana interna. El complejo resultante es competente para la exportación únicamente de aquellas proteínas que son necesarias para formar el complejo de aguja. Una vez que éste está formado, esta maquinaria es capaz de secretar

las proteínas destinadas a ser liberadas hacia el interior de las células hospedadoras (Zhou y Galán, 2001).

El propósito biológico de los SSTT es translocar las proteínas del citosol bacteriano, a través de membranas lipídicas, hacia el hospedador eucariótico, funcionando así como una “jeringa molecular”. A diferencia de otros sistemas de secreción, las proteínas que son translocadas vía el SSTT, lo hacen mediante un mecanismo sec-independiente, es decir, no presentan una secuencia amino terminal (péptido señal) que sea reconocida y cortada en el periplasma, sino que son transportadas desde el citoplasma bacteriano hasta la célula eucariótica directamente (Thanassi y Hultgren, 2000).

El SSTT es exclusivo de bacterias Gram negativas y está presente en gran variedad de especies, en las que lleva a cabo funciones que van desde efectos antifagocíticos y citotóxicos en las células hospedadoras, invasión de las células hospedadoras y patogénesis intracelular, hasta el establecimiento de relaciones simbióticas (Kuhle y Hensel, 2004).

Mucho se ha discutido sobre el hecho de que los inyectisomas y el flagelo bacteriano están evolutivamente relacionados debido a que comparten similitudes estructurales y funcionales, sin embargo hasta ahora su relación filogenética precisa es desconocida (Blocker *et al.*, 2003; Pallen *et al.*, 2005).

- **Mecanismos moleculares en la patogénesis de *Salmonella***

Salmonella entra al hospedador por vía oral a través de agua y de alimentos contaminados. Usualmente sólo un pequeño porcentaje de los microorganismos ingeridos es capaz de sobrevivir el pH ácido del estómago y llegar al intestino delgado, donde entran en contacto con los enterocitos y las células M de las placas de Peyer (Audia *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 1994). En la figura 4 se muestran los eventos en la patogénesis de la infección de *Salmonella* y los genes de virulencia asociados.

La adherencia es un paso importante durante la colonización intestinal; su papel durante la invasión parece ser la selección de una célula blanco para utilizarla como puerta de entrada. La adherencia fimbrial puede cumplir varias funciones durante la fase intestinal de la infección, al mediar la adhesión hacia varios tipos celulares.

El genoma de cada serotipo del género *Salmonella* contiene un gran número de operones fimbriales que codifican una amplia variedad de fimbrias con distinta especificidad de unión y que pueden actuar sinérgicamente durante la infección. Se ha propuesto que cada operón es requerido únicamente para la adhesión e invasión de una línea celular individual (Baumler *et al.*, 1996). Así, la fimbria permite que la bacteria reconozca entre diversos tipos celulares, por lo que se le ha involucrado en la adaptación al hospedero y, por lo tanto, podría explicar la especificidad de algunos serotipos por un hospedador en particular.

En *S. Typhimurium* se encuentran 6 operones fimbriales dependientes de chaperonas, incluyendo *fim* (fimbria tipo I), *pef* (plasmid-encoded fimbriae), *stf* (*S. typhimurium* fimbriae), *bcf* (bovine colonization factor), *saf* (*Salmonella* fimbriae) y *lpf*

(long polar fimbriae). De manera interesante, se ha reportado que ésta última media la adhesión a las placas de Peyer, hecho que es importante debido a que son las células M de las placas de Peyer los sitios que preferencialmente utiliza *Salmonella* para invadir en el modelo murino (Darwin y Miller, 1999).

Salmonella se adhiere a las células del íleon y a las células M que, debido a la ausencia del borde de cepillo, así como de glucocálix, representan una vía de entrada ideal (Jepson y Clark, 1998). Mientras que estas células parecen ser el sitio primario de entrada en el modelo murino, en el modelo bovino tanto los enterocitos como las células M son invadidas por *Salmonella* (Frost *et al.*, 1997).

Después del contacto con las células del epitelio intestinal, *S. Typhimurium* transloca proteínas efectoras dentro del citosol de la célula hospedadora vía el SSTT de la SPI-1. Algunas de estas proteínas tienen actividad cinasa, fosfatasa o de unión a actina. Una vez en el citosol, alteran las vías de transducción de señales que promueven cambios en el citoesqueleto, lo cual permite la formación de proyecciones citoplásmicas (estructuras llamadas “membrane ruffles”), que median la internalización bacteriana en las células epiteliales (Francis *et al.*, 1993; Ginocchio *et al.*, 1994). Este proceso es conocido como endocitosis mediada por bacterias.

Inicialmente, SipC se une a los filamentos de actina y provoca la polimerización de ésta, lo cual resulta en los rearrreglos del citoesqueleto (Hayward *et al.*, 1999; Zhou y Galán, 2001). Por otro lado, SipA se une directamente a filamentos de actina e inhibe su despolimerización (Zhou *et al.*, 1999a). Por lo tanto, SipA puede incrementar la estabilidad de los haces de actina que dirigen y mantienen el “ruffling” de la membrana y los filopodios que finalmente englobarán e internalizarán a la bacteria. De esta manera, SipC es esencial para la nucleación de actina, mientras que SipA actúa mejorando la eficiencia de este proceso.

SopE y SopE2 se comportan como GEF (guanine exchange factor) y de esta manera son las proteínas responsables de activar las GTPasas de la familia Rho, incluyendo Cdc42 y Rac, las cuales son moduladoras del citoesqueleto (Bakshi *et al.*, 2000; Stender *et al.*, 2000; Friebel *et al.*, 2001). La activación de estas dos GTPasas provoca el reclutamiento y activación de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP), tales como proteínas de la familia SCAR (supresor of cAMP receptor)/WAVE (WASP-family verprolin homology protein), lo cual promueve la polimerización y nucleación de actina mediante la activación del complejo Arp2/3 (actin-related protein2/3) (Criss y Casanova, 2003).

Posteriormente, SptP revierte los rearrreglos del citoesqueleto provocados por SopE, al desactivar a las GTPasas Cdc42 y Rac1; de esta manera restaura la estructura normal del citoesqueleto (Fu y Galán, 1998). Esto indica que *Salmonella* es capaz de regular en su favor los procesos celulares existentes en las células.

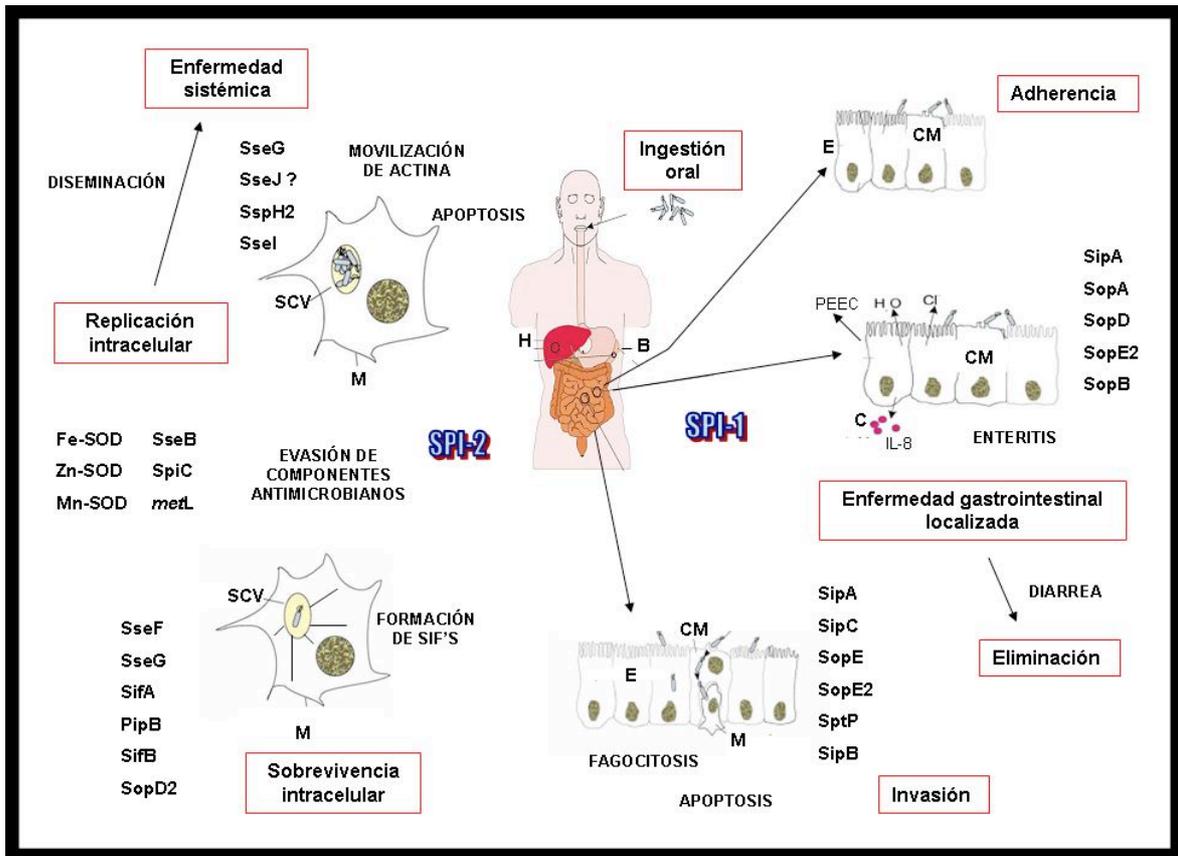


Fig. 4 Modelo de los eventos involucrados en la patogénesis de *Salmonella*. CM: células M; E: células epiteliales; C: citocinas; PEEC: pathogen-elicited epithelial chemoattractant; M: macrófagos; SCV: *Salmonella*-containing vacuoles.

Se ha propuesto que los neutrófilos tienen un papel muy importante en la diarrea inducida por *Salmonella*, debido a que modelos animales como el ratón, que no desarrolla diarrea, responden a la infección con un infiltrado mononuclear (macrófagos) principalmente (Santos *et al.*, 2001). Por otro lado, la administración de fármacos anti-inflamatorios o sustancias que reducen las reservas de neutrófilos, provoca la disminución en la secreción de fluido intestinal inducido por la infección con *Salmonella* (Gianella *et al.*, 1975). Además, la respuesta inflamatoria caracterizada por infiltración de neutrófilos, precede a la secreción de fluido intestinal en infecciones por *S. Typhimurium* (Santos *et al.*, 2003).

En conjunto, las proteínas SipA, SopA, SopB, SopD y SopE2, inducen la diarrea y la respuesta inflamatoria en las infecciones por *Salmonella* (Zhang *et al.*, 2002).

SopB, con su actividad de inositol fosfato fosfatasa, media la secreción de fluidos al aumentar la secreción de cloro como consecuencia de la hidrólisis del fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PI3), que es un inhibidor de la secreción de cloro dependiente de calcio (Galyov *et al.*, 1997; Wood *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 2001).

Además, su actividad produce 1,4,5,6-tetrakisfosfato, una molécula que induce la secreción de cloro (Norris *et al.*, 1998). SopD tiene un efecto aditivo al de SipB. Las proteínas SipA y SopA están involucradas en la inducción de migración transepitelial de los neutrófilos (Lee *et al.*, 2000b)

La entrada de *Salmonella* a las células epiteliales induce el incremento de calcio intracelular, lo que provoca la expresión y liberación de interleucina 8 (IL-8), un factor quimiotáctico para los neutrófilos. Este proceso es dependiente de MAPquinasas y de un STT funcional (Eckmann *et al.*, 1993). El papel de la IL-8 consiste en reclutar a los neutrófilos hacia el espacio subcelular. Posteriormente, otro quimioatrayente conocido como PEEC (pathogen-elicited epithelial chemoattractant), induce la migración transepitelial de estas células (McCormick *et al.*, 1998).

La exacerbada respuesta inflamatoria ocasiona la acumulación de células inflamatorias y fluido rico en proteínas en el lumen intestinal; además de la migración transepitelial de los neutrófilos, hecho que destruye la integridad del epitelio, agravando la enfermedad gastrointestinal (Santos *et al.*, 2003). Debido a la liberación de proteasas, se produce la necrosis extensiva de la mucosa intestinal, lo que provee un sustrato adecuado para la proliferación bacteriana y facilita posteriormente la liberación de la bacteria hacia el medio ambiente y la contaminación de éste.

Después de la invasión de las células, la bacteria llega a la porción basal del epitelio, donde es fagocitada por los neutrófilos atraídos y por los macrófagos presentes en la lámina propia. De esta manera, las bacterias son diseminadas dentro de las células fagocíticas hacia el hígado y el bazo. Se ha reportado que *S. Typhimurium* puede llegar a hígado y a bazo por una ruta alterna que no requiere colonización intestinal o invasión de células epiteliales intestinales. En esta vía, la bacteria es transportada directamente desde el lumen del intestino a la circulación sanguínea, bazo e hígado mediante fagocitos que expresan CD18 (Vázquez-Torres *et al.*, 1999).

Dentro de las células, la bacteria permanece dentro de una vacuola (*Salmonella*-containing vacuole; SCV), donde empieza a replicarse. Una propiedad importante para la virulencia de *Salmonella* es el ser un patógeno intracelular facultativo que puede sobrevivir y multiplicarse en el interior tanto de los fagocitos profesionales como las células no fagocíticas, en las SCV's (García del Portillo, 2001; Hansen-Wester y Hensel, 2001). Las SCV de las células epiteliales contienen concentraciones limitantes de magnesio y hierro, y un pH moderadamente ácido.

Salmonella transloca a través de la membrana de las SCV's, varias proteínas efectoras hacia el citosol de la célula hospedadora mediante un segundo STT, el codificado en la SPI-2. Las funciones moleculares de la SPI-2 no han sido caracterizadas con tanto detalle como las de la SPI-1, y sólo se ha sugerido una probable función para algunas de las proteínas efectoras. Algunos estudios han demostrado que la SPI-2 es requerida para la inhibición de varias etapas de la vía endocítica, incluyendo la fusión entre los lisosomas y las SCV's, la muerte dependiente de oxidasas NADPH por parte de los macrófagos, la muerte celular tipo apoptosis, el control de la dinámica de las SCV's, el ensamblado de una red de actina alrededor de las SCV's y la interferencia con la localización de sintasas de óxido nítrico (iNOS) en las SCV's (Uchiya *et al.*, 1999; Vázquez-Torres *et al.*, 2000; Beuzón *et al.*, 2000., Méresse *et al.*, 2001; Catron *et al.*, 2002; Chakravorty *et al.*, 2002; Kuhle y Hensel, 2004).

Estudios en células epiteliales han revelado que alrededor de las 4-6 horas post-infección, la reorganización de membranas endosomales inducidas por la bacteria comienza a ser evidente por la aparición de Sif's. Estos son estructuras filamentosas y tubulares que se originan a partir de las SCV's y se extienden desde la membrana de estos compartimentos a través de la célula entera, eventualmente conectando SCV's separadas. Un estudio reveló que estas proyecciones también se forman en los macrófagos (Kuhle y Hensel, 2004).

Los Sif's aparecen cuando la bacteria inicia su replicación; su formación ocurre sobre un sostén de microtúbulos. Las efectoras SseF y SseG son reponsables de inducir el reclutamiento masivo de microtúbulos en estadios tardíos de la infección, mientras que SifA es la principal proteína efectora necesaria para la inducción de estas estructuras (Kuhle y Hensel, 2004). SifA es requerida para mantener la integridad membranal de las SCV's, además, es esencial para la sobrevivencia intramacrófago (Beuzon *et al.*, 2000). La función de los sif's no se ha elucidado; pero varias proteínas efectoras, entre ellas PipB, SifB y SopD2, se localizan en estos filamentos (Waterman y Holden, 2003; Guiney y Lesnick, 2005).

S. enterica ha desarrollado diferentes mecanismos para evadir el daño causado por componentes antimicrobianos tales como las especies reactivas tóxicas de oxígeno (ROI) o los intermediarios de nitrógeno (RNI). Las proteínas secretadas de SPI-2 interfieren con el tráfico de oxidasas NADPH hacia las SCV's y evitan, por tanto, la exposición hacia estos metabolitos (Vázquez-Torres y Fang, 2001). Se ha propuesto que SseB es necesaria para prevenir la localización de NDPH oxidasa, así como la formación de radicales reactivos de oxígeno en la membrana del fagosoma de macrófagos murinos. Sin embargo, no se sabe si este efecto es debido a la actividad directa de SseB dentro del macrófago o si esta proteína se requiere para translocar otras proteínas al interior de los macrófagos (Vázquez-Torres *et al.*, 2000).

Por otro lado, SpiC interfiere con el tráfico celular al inhibir la fusión de los fagosomas que contienen a *Salmonella* con los lisosomas, evitando así la exposición a las enzimas lisosomales (Uchiya *et al.*, 1999). Se han reportado dos proteínas blanco para SpiC, llamadas TassC y Hook3. Se ha propuesto que la primera podría ser requerida para la fusión de distintos compartimentos endosomales con el fagosoma, mientras que la segunda es miembro de una familia de proteínas involucrada en tráfico celular y se ha propuesto que une organelos específicos a los microtúbulos (Kuhle y Hensel, 2004). Así mismo, se ha reportado que SpiC es necesaria tanto para la secreción *in vitro* de SseB, SseC y SseD, como para la translocación de proteínas efectoras dependientes del SSTT de la SPI-2 de la bacteria contenida en la vacuola, hacia el citosol de los macrófagos infectados (Freeman *et al.*, 2002).

Aunado a lo anterior, *Salmonella* expresa enzimas que inactivan directamente radicales tóxicos de oxígeno y nitrógeno, como la homocisteína (gen *metL*). Además produce superoxidodismutasas (SODs) como Fe-SOD (*sodB*), Mn-SOD (*sodA*), Cu, Zn-SOD (*sodC*) (Figueroa y Verdugo-Rodríguez, 2005).

Se ha reportado que la capacidad para crecer dentro de los macrófagos depende de la especificidad de hospedador del serotipo de *Salmonella* involucrado. Así, el serotipo Typhimurium tiene mayor capacidad para proliferar dentro de macrófagos

murinos, mientras que el serotipo Typhi crece mejor en macrófagos humanos (Schwan *et al.*, 2000).

La proteína SseJ es 30% idéntica a una acetiltransferasa de *Aeromonas*; debido a esto se ha sugerido que su función es modificar los lípidos de membrana de las SCV's para facilitar la replicación y división celular (Waterman y Holden, 2003).

SseG localiza las SCV's en la cercanía del aparato de Golgi de la célula hospedadora; se ha demostrado que es necesario un Golgi intacto y funcional para que la replicación intracelular de *Salmonella* se lleve a cabo (Salcedo y Holden, 2003). Se ha sugerido que el contacto cercano entre las membranas del SCV's y el Golgi podría facilitar eventos de fusión transitorios entre estos dos compartimentos, lo que resultaría en la adquisición de moléculas requeridas por *Salmonella* para proliferar.

La formación de una red de actina alrededor de las SCV's es importante para el mantenimiento de la integridad de estas membranas, así como para la replicación intracelular de *Salmonella* en los macrófagos. En estos eventos participan SspH2 y SseI, que interactúan con el citoesqueleto de actina (Kuhle y Hensel, 2004).

Después de que las bacterias se han replicado, se liberan hacia el torrente sanguíneo y causan septicemia y la invasión generalizada en el organismo; de esta forma llegan a colonizar órganos como el hígado y el bazo, entre otros (Jones y Falkow, 1996; Hansen-Wester y Hensel, 2001).

Se ha reportado que *S. Typhimurium* puede inducir la muerte celular en macrófagos. Se han descrito tres diferentes formas de citotoxicidad en macrófagos infectados. La primera es dependiente de SPI-1, se lleva a cabo 40 min después de la infección y es mediada por la interacción de SipB con la caspasa-1, una proteasa conocida como enzima convertidora de IL-1 β , ya que activa a esta potente citocina proinflamatoria (Arai *et al.*, 1995; Hersh *et al.*, 1999). Debido al requerimiento de caspasa-1 y a la naturaleza proinflamatoria de este proceso, así como las diferencias que presenta con la apoptosis, se ha propuesto el nombre de "piroptosis", como un término que describe la muerte celular programada proinflamatoria (Cookson *et al.*, 2001).

Un segundo mecanismo retardado se da 4-6 horas después de la infección e involucra la activación de las caspasas 2, 3, 6 y 8 y está asociado con la liberación de citocromo c de la mitocondria. En este caso, también se encuentra involucrado SipB (Kuhle y Hensel, 2004).

El tercer mecanismo es SPI-1 independiente y se presenta 6 horas después de la infección, siendo morfológicamente más aparente entre las 12 y 14 horas posteriores a la infección. El regulador de respuesta OmpR y los genes de SPI-2 son requeridos para la inducción de este mecanismo, aunque los efectores de SPI-2 involucrados no han sido identificados (Kuhle y Hensel, 2004).

Para llevar a cabo el estudio de las patologías humanas causadas por *Salmonella*, los modelos animales han sido una herramienta invaluable. *S. Typhimurium* causa en los ratones una enfermedad sistémica que semeja la que causa *S. Typhi* en humanos. Por tal motivo, las infecciones de ratones se emplean como modelo para el estudio de la enfermedad sistémica (fiebre tifoidea). Por otro lado, *S. Typhimurium* provoca en los

becerros únicamente enfermedad intestinal, por lo que las infecciones en estos animales se emplean como modelos para el estudio de la enfermedad intestinal (gastroenteritis no tifoideas) (Santos *et al.*, 2001).

Por otro lado, los ensayos con cultivos celulares son de utilidad para estudiar etapas específicas de la infección, ya que permiten evaluar los eventos que se dan durante la interacción microorganismo-célula hospedadora. Se han empleado cultivos de macrófagos o de células epiteliales, para estudiar la replicación intracelular de *Salmonella* y su mecanismo de invasión, mediados por genes de SPI-2 y SPI-1, respectivamente.

De acuerdo a los eventos que se presentan durante el establecimiento de la infección por *Salmonella*, los genes que se encuentran en SPI-1 son necesarios para iniciar la infección intestinal, es decir, para la invasión de las células epiteliales (Galán y Curtís, 1989; Ochman *et al.*, 1996). Así mismo, los genes de la SPI-2 son importantes para la sobrevivencia y replicación dentro de los macrófagos y, por lo tanto, para el establecimiento de la infección sistémica (Shea *et al.*, 1996; Hensel *et al.*, 1998). Así, mutantes en genes de SPI-1 están severamente afectadas en la invasión a células epiteliales en cultivo y presentan atenuación en el modelo bovino para producir la infección gastrointestinal; sin embargo, esto no se presenta en el modelo murino (Galán y Curtís, 1989; Ochman *et al.*, 1996). Mientras que mutantes en genes de SPI-2 están afectadas en su capacidad de replicarse dentro de macrófagos y presentan una atenuación drástica en la producción de la infección sistémica, en el ratón (Shea *et al.*, 1996; Hensel *et al.*, 1998).

- **Regulación de los genes de SPI-1 y SPI-2**

Regulación ambiental

Dada su función en diferentes etapas de la patogénesis de *Salmonella*, podría esperarse que los genes de SPI-1 y SPI-2 se expresen en respuesta a diferentes señales ambientales (Fig. 5).

In vivo, se ha visto que hay una regulación diferencial inversa de los genes de SPI-1 y SPI-2; mientras que la expresión de los genes de SPI-2 se induce dentro de macrófagos, la expresión de los genes de SPI-1 se reprime (Cirillo *et al.*, 1998; Eriksson *et al.*, 2003). *In vitro*, se ha empleado el crecimiento en el medio de cultivo rico en nutrientes LB (Luria-Bertani) como una condición que favorece la expresión de los genes de SPI-1. Para el caso de los genes de SPI-2, se ha empleado el medio mínimo con baja concentración de magnesio y fosfato, como una condición que favorece la expresión de los genes de esta isla. Así, las condiciones que proporcionan estos medios de cultivo, podrían ser semejantes a las condiciones ambientales encontradas por *Salmonella* en el nicho del hospedero en el que se requiere la expresión de estos genes.

El oxígeno es un factor clave dentro de la regulación de los genes que *Salmonella* necesita para invadir (Altier, 2000). La expresión de los genes de SPI-1 se induce en condiciones de baja tensión de oxígeno; esto podría explicarse por el hecho de que el lumen del intestino delgado y el colon son anaeróbicos, mientras que el borde de cepillo del intestino delgado se considera microaerofílico y éstos son los sitios en los

que *Salmonella* requiere de genes necesarios para la invasión (Jones y Falkow, 1994; Russell *et al.*, 2004). La alta osmolaridad del intestino (mayor a 300 mOsm) causa cambios en el superenrollamiento del ADN, lo que induce la expresión de los genes de SPI-1 y favorece la invasión. (Galán y Curtis, 1990). Por otro lado, aunque el pH del tracto intestinal varía con la dieta, el pH que existe en el intestino delgado y el colon típicamente fluctúa entre 6 y 7; *in vitro* este pH también favorece la expresión de los genes de SPI-1 (Bajaj *et al.*, 1996).

Como resultado de los procesos digestivos y la acción de la flora bacteriana residente, el tracto gastrointestinal de los mamíferos contiene altas concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como acetato, propionato y butirato. La concentración de estos varía a través del tracto gastrointestinal. Bajas concentraciones de estos ácidos en el intestino delgado (30 mM), principalmente acetato, favorecen la expresión de los genes de SPI-1 e inducen la invasión (Durant *et al.*, 2000; Lawhon *et al.*, 2002). Así mismo, altas concentraciones en el intestino grueso (200 mM), principalmente de propionato y butirato, la suprimen, lo que indica que el ambiente colónico evita la invasión de esta porción del intestino (Lawhon *et al.*, 2002).

Existen además factores ambientales que no favorecen la expresión de los genes de SPI-1. Dentro de éstos se encuentra la bilis, que es secretada en la porción proximal del intestino delgado, un área no usada por *Salmonella* para la invasión (Prouty y Gunn, 2000). Finalmente, se ha reportado que péptidos catiónicos existentes dentro de los macrófagos también ejercen un efecto negativo sobre la expresión de genes de la SPI-1 (Bader *et al.*, 2003).

Por otro lado, para el caso de la SPI-2, diversos estudios han mostrado que la inducción de sus genes no se limita al interior de los macrófagos, sino que también ocurre dentro de las células epiteliales infectadas. Se ha reportado que concentraciones limitantes de cationes divalentes (calcio y magnesio) y fosfato, favorecen la expresión de los genes de esta isla (García Vescovi *et al.*, 1996; Deiwick *et al.*, 1999).

Así mismo, se ha demostrado que el pH ácido es otra condición que favorece la expresión de los genes de SPI-2, ya que la inhibición de la acidificación del fagosoma reduce la replicación intracelular de *S. Typhimurium*. Puesto que el pH ácido por sí solo no afecta la expresión de genes de SPI-2, se ha sugerido que existen genes cuya expresión es inducida por bajo pH, y otros cuya expresión es inducida por otras señales tales como la disminución de nutrientes o las bajas concentraciones de los cationes divalentes (Deiwick *et al.*, 1999).

La expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 está controlada, además, por la fase de crecimiento bacteriano, la motilidad y la utilización de carbohidratos (Lee y Falkow, 1990; Jones *et al.*, 1992., Schiemann, 1995).

Reguladores positivos y negativos de los genes de SPI-1

Como ya se mencionó, además de las proteínas efectoras y las chaperonas, así como de los componentes estructurales del SSTT, en SPI-1 y SPI-2 también se encuentran codificados reguladores transcripcionales que controlan la expresión de los genes de estas islas (Figs. 1 y 2).

La regulación de los genes contenidos en la SPI-1 es compleja debido a la gran cantidad de reguladores que participan en ella, por lo que hasta la fecha no se han podido elucidar completamente los mecanismos moleculares que controlan su expresión.

El regulador central de la SPI-1 es HilA (Hyperinvasive locus A), un miembro de la familia de reguladores transcripcionales de OmpR/ToxR. Este regulador fue identificado originalmente como un locus que al sobre-expresarse, confería un fenotipo hiperinvasivo y contrarrestaba los efectos negativos de señales ambientales que reprimen la invasión, como las altas concentraciones de oxígeno (Lee *et al.*, 1992).

HilA activa directamente los operones *prg/org* (phosphate repressed genes/oxigen regulated genes) e *inv/spa* (Bajaj *et al.*, 1995; Lostroh y Lee, 2001a; Altier, 2002; Jones, 2005), al unirse directamente a sus regiones promotoras, en sitios denominados “cajas HilA” (HilA boxes). Recientemente se ha reportado que HilA puede unirse directamente a la región reguladora de *spi4_H*, *sicA* y *hila* (De Keersmaecker *et al.*, 2005).

HilA activa un segundo activador transcripcional, InvF, un miembro de la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS, al unirse directamente a la región reguladora de *invF* (Lostroh *et al.*, 2000). InvF, a su vez, induce la expresión de los operones *sip/sic* uniéndose directamente a sus regiones reguladoras (Darwin y Miller, 1999). Además, InvF y la chaperona SicA controlan la expresión de SopB/SigD y de SopE, que están codificadas fuera de SPI-1 (Eichelberg y Galán, 1999). Por lo tanto, la acción secuencial de HilA e InvF, parece coordinar la expresión de muchos genes requeridos para la invasión.

La expresión de HilA está controlada por un complejo circuito de regulación que involucra algunos reguladores adicionales codificados en SPI-1, como HilD y HilC, los cuales pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales de AraC/XylS (Schechter *et al.*, 1999; Lucas y Lee, 2000; Schechter y Lee, 2001; Boddicker, *et al.*, 2003; Olekhnovich y Kadner, 2004).

HilD y HilC inducen la expresión de *hila*, al contrarrestar la represión que ejercen H-NS y Hha sobre su promotor. (Schechter *et al.*, 1999; Lucas y Lee 2001; Schechter y Lee 2001; Olekhnovich y Kadner, 2002; Boddicker *et al.*, 2003).

HilD es claramente importante para la invasión, ya que en una mutante *hilD* se afecta el fenotipo de invasión en células epiteliales y la expresión de genes de SPI-1 (Schechter *et al.*, 1999; Akbar *et al.*, 2003). El papel de HilC es menos claro, ya que en una mutante *hilC* se afecta sólo ligeramente el fenotipo de invasión y la expresión de los genes de SPI-1 (Eichelberg *et al.*, 1999; Schechter *et al.*, 1999).

Adicionalmente, se ha reportado que HilD y HilC pueden inducir la expresión de InvF por una vía independiente de HilA, puesto que se unen a un promotor de *invF* que se encuentra corriente arriba del promotor dependiente de HilA (Akbar *et al.*, 2003). Así mismo, se ha descrito que HilD y HilC controlan su propia expresión y se regulan positivamente uno al otro, creando así un circuito complejo de regulación por retroalimentación (Olekhnovich y Kadner, 2004).

Existen algunos reguladores que se encuentran fuera de la SPI-1 y que también controlan positivamente la expresión de *hilA*.

CsrA y CsrB son dos reguladores que controlan la expresión de *hilA* mediante la modulación de los niveles de los transcritos de *hilC* y *hilD*. La proteína CsrA desestabiliza moléculas específicas de ARNm por interacciones en los sitios de unión a ribosomas (RBS). El gen *csrB* codifica un ARN no traducido que antagoniza la función de CsrA uniéndose a 18-20 moléculas de éste y secuestrándolo para evitar la degradación del ARNm (Yang *et al.*, 1996). Así, el sistema regulador *csrA/csrB* parece mantener niveles apropiados de los transcritos de *hilC* y *hilD* para la posterior activación de *hilA*.

HU, Fis, FliZ y FadD son reguladores que se requieren también para la expresión de *hilA* (Pinson *et al.*, 1999; Schechter *et al.*, 2003; Altier, 2002; Jones, 2005). HU está compuesto de dos unidades similares, aunque no idénticas, codificadas por los genes *hupA* y *hupB* (Pinson *et al.*, 1999; Schechter *et al.*, 2003). Fis es una proteína de unión al ADN sitio-específica que induce curvaturas (Wilson *et al.*, 2001; Schechter *et al.*, 2003). FliZ es codificado en un operón junto con *fliA* (Ikebe *et al.*, 1999), el cual codifica un factor sigma alternativo requerido para la expresión de genes flagelares (Oshini *et al.*, 1990; Iyoda *et al.*, 2001). FadD es una acilcoenzima A sintetasa requerida para el consumo y degradación de ácidos grasos de cadena larga (DiRusso *et al.*, 1999).

Existen varios reguladores que tienen efecto negativo sobre los genes de la SPI-1. Esto probablemente es debido a la necesidad de limitar la expresión de los genes de *Salmonella* únicamente al sitio y momento adecuados, de lo contrario sería improductivo y perjudicial para el propio microorganismo.

La proteasa Lon ha sido identificada como un importante regulador negativo de la expresión de *hilA*. Se ha propuesto que Lon degrada a HilD bajo condiciones ambientales represoras, con lo que controla indirectamente la expresión de *hilA* (Takaya *et al.*, 2003; Boddicker y Jones, 2004). Por otro lado, se ha sugerido que HilE funciona como un represor al unirse a HilD para evitar que éste active a *hilA* (Baxter *et al.*, 2003). De manera interesante, se ha encontrado que bajo condiciones represoras, HilA es capaz de unirse a su propia región reguladora y autoregularse negativamente (De Keersmaecker *et al.*, 2005).

El sistema de dos componentes PhoP/PhoQ funciona en respuesta a las bajas concentraciones de magnesio. Como se mencionará más adelante, es esencial para la expresión de los genes de SPI-2, pero también funciona como represor de los genes de SPI-1, específicamente de los genes *prgs* (PhoP-repressed genes). El sistema de dos componentes PhoR/PhoB puede también regular negativamente la expresión de *hilA*, en respuesta a bajas concentraciones de fosfato (Lucas y Lee, 2001).

H-NS y Hha son dos reguladores globales que reprimen también la expresión de *hilA* (Fahlen *et al.*, 2001; Schechter, 2003). H-NS es una proteína tipo histona que se une al DNA en regiones ricas en A-T y es capaz de multimerizar para formar complejos sobre los promotores de los genes que regulan, impidiendo de esta manera su expresión (Dorman y Deighan 2003). Se ha demostrado que H-NS es el encargado de silenciar

selectivamente genes adquiridos por transferencia horizontal, lo cual provee a la bacteria de un mecanismo que la protege de los efectos detrimentales que puede ocasionar la expresión no controlada de genes de nueva adquisición (Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006). Hha es miembro de la familia de proteínas tipo histona asociadas a nucleóide que incluye a H-NS, HU y YmoA (Fahlen *et al.*, 2001). Además de reducir significativamente la expresión de *hila*, se ha reportado que la sobreexpresión de Hha reduce la transcripción de genes necesarios para la invasión que son regulados por HilA, como *invF*, *prgH* y *sipC* (Fahlen *et al.*, 2001). Recientemente, en un estudio se reportó que la acción cooperativa de H-NS y Hha es la responsable del silenciamiento de *hila* bajo condiciones de baja osmolaridad (Olekhnovick y Kadner, 2006). Estos dos reguladores pueden unirse individualmente a múltiples sitios ricos en A-T en las secuencias que flanquean *hila*.

Reguladores positivos y negativos de los genes de SPI-2

La regulación de la expresión de los genes de SPI-2 parece ser menos compleja que la de los genes de SPI-1. En este caso, la expresión de los genes de SPI-2 es dependiente del sistema de dos componentes SsrA/B, codificado en esta isla (Valdivia y Falkow, 1997; Deiwick *et al.*, 1999; Hensel, 2000). El sistema SsrA/B induce la expresión de los genes de SPI-2 en respuesta a bajas concentraciones de calcio, pH bajo y baja osmolaridad (Garmendia *et al.*, 2003).

SsrA (SpiR), una proteína de 104 kDa, es la cinasa detectora de señales ambientales que fosforila a SsrB, el cual induce entonces la transcripción de los operones *sse*, *ssc* y *ssa*. (Ochman *et al.*, 1996). Se ha propuesto que SsrB es capaz de unirse a su propia región reguladora e inducir su expresión (Feng *et al.*, 2003).

La expresión de SsrA/B es a su vez controlada positivamente por los sistemas de dos componentes EnvZ/OmpR y PhoP/PhoQ, codificados fuera de SPI-2 (Deiwick *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000a; Bijisma y Groisman, 2005).

El sistema EnvZ/OmpR modula la expresión de genes en respuesta a condiciones osmóticas y de pH. Una vez que EnvZ detecta pH bajo y disminución en la osmolaridad, fosforila a OmpR, el cual puede unirse tanto a la región promotora de *ssrA* como a la de *ssrB* (Feng *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2004).

El sistema PhoP/PhoQ controla más de 40 genes de virulencia, algunos de los cuales están involucrados en la supervivencia intramacrófago. PhoQ es la detectora de señales ambientales que fosforila a PhoP en respuesta a las concentraciones limitantes de magnesio que existen dentro de los macrófagos (García Vescovi *et al.*, 1996). Como ya se mencionó, actúa como un “switch” molecular, activando genes requeridos para la sobrevivencia intramacrófago, mientras que reprime aquellos necesarios para la invasión. PhoP induce la expresión del sistema SsrA/B al unirse directamente a la región reguladora de *ssrB*, lo cual se ha observado tanto *in vitro* como *in vivo*, cuando *Salmonella* se encuentra dentro de los macrófagos (Bijisma y Groisman, 2005).

El regulador transcripcional SlyA, de la familia de reguladores MarR/SlyA, también actúa como regulador positivo de la expresión del sistema SsrA/B (Libby *et al.*, 1994). Se ha reportado que exhibe redundancia funcional con OmpR-EnvZ, ya que la

presencia de uno de ellos es capaz de compensar parcialmente la ausencia del otro (Linehan *et al.*, 2005). PhoP regula positivamente la expresión de SlyA, al unirse directamente a la región reguladora del gen que codifica a este regulador (Norte *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2004).

YdgT tiene la actividad de regulador negativo para la expresión de SPI-2 (Coombes *et al.*, 2005). Esta proteína comparte una identidad de 39% y 35% con YmoA y Hha, respectivamente, las cuales modulan negativamente la expresión de genes de virulencia en *Yersinia* y *E. coli* (Madrid *et al.*, 2002).

Recientemente se reportó que el regulador Hha actúa como represor de la expresión de los genes de SPI-2 antes de que la bacteria detecte los factores ambientales que inducen su expresión, como bajas concentraciones de magnesio, de fosfato y el pH ácido (Silphaduang *et al.*, 2007).

En la figura 5 se muestra un esquema de las redes que forman los reguladores que controlan la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2.

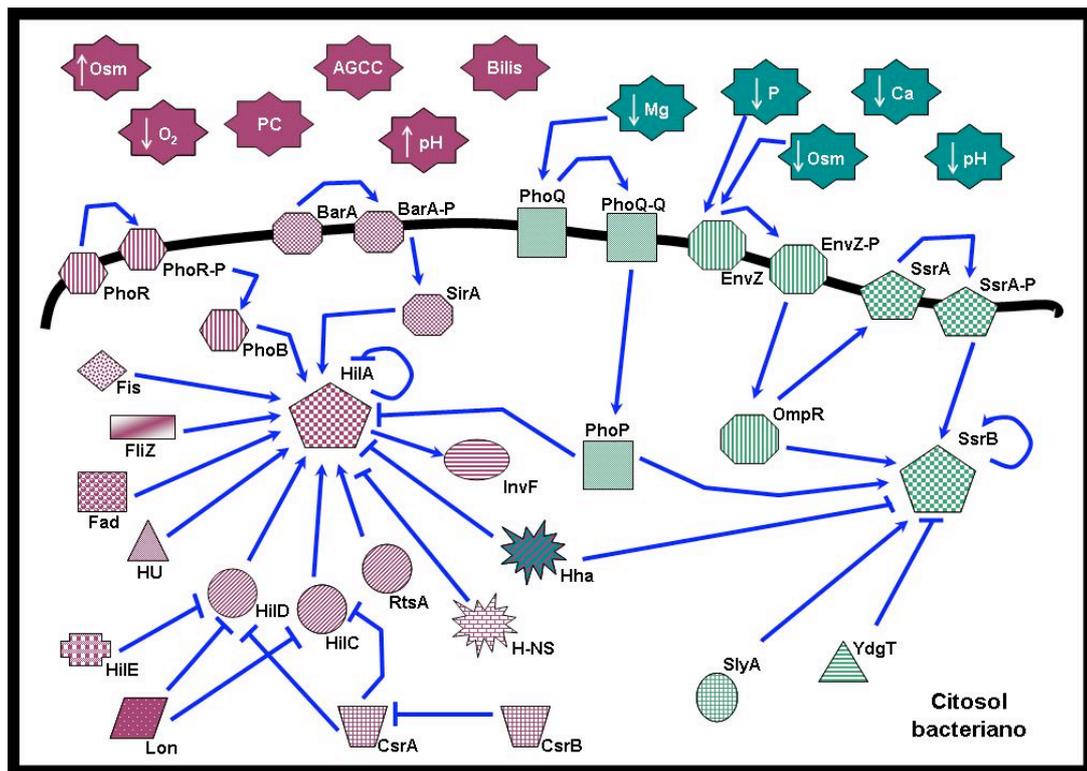


Fig. 5. Modelo de la regulación de genes de la SPI-1 y SPI-2. Se muestran en violeta los reguladores que tienen efecto sobre la expresión de genes de SPI-1 y en verde los reguladores que tienen efecto sobre la expresión de genes de SPI-2. Las flechas truncadas significan regulación negativa, mientras que las flechas continuas indican regulación positiva.

2. ANTECEDENTES

Los genes de SPI-1 se encuentran bajo un complejo control por parte de varios reguladores transcripcionales que se encuentran codificados tanto dentro de la isla, como fuera de ella. Sin embargo, pese a los diversos estudios que se han realizado, aún no es claro cómo todos estos reguladores se coordinan para inducir la expresión de *hilA*. Más aún, el papel de varios de ellos es controversial ya que su efecto sólo se observa cuando son sobre-expresados.

De los principales reguladores codificados fuera de las SPI's, que tienen un claro efecto en la expresión de los genes de SPI-1, se encuentra SirA (“*Salmonella* invasion regulator”) (Heeb y Haas, 2001), un regulador de respuesta que forma parte del sistema de dos componentes BarA/SirA. BarA es la cinasa detectora de señales ambientales. Sin embargo, las señales ambientales que detecta, aún no se han identificado.

SirA es un regulador transcripcional de la familia FixJ; las proteínas de esta familia se caracterizan por tener un dominio HTH (“Helix-turn-helix”) de unión al ADN en el extremo carboxilo terminal y un dominio regulador en el extremo amino terminal (Johnston *et al.*, 1996). SirA comparte un 96% de identidad con UvrY de *E. coli* y un 58% de identidad con el regulador GacA de *Pseudomonas fluorescens* (Johnston *et al.*, 1996). Además de éstos dos, se han reportado otros homólogos de SirA en *Erwinia carotovora*, *Legionella pneumophila* y *Vibrio cholerae* (ExpA, LetA y VarA, respectivamente), que se requieren para la producción de factores de virulencia (Eriksson *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1998). En adición a la expresión de genes de virulencia, los ortólogos de SirA regulan negativamente la expresión de genes flagelares y/o la motilidad en *E. coli*, *S. typhimurium*, *Pseudomonas* y *Vibrio cholerae* (Goodier y Ahmer, 2001).

BarA, la cual es un miembro de la familia de proteínas sensoras histidina cinasas (Lawhon *et al.*, 2002), presenta una estructura modular que consiste de un dominio periplásmico amino terminal, un dominio autocinasa citosólico con una histidina típica, un dominio regulador de respuesta con un invariable aspartato y un extremo carboxilo terminal de fosfotransferencia que tiene una histidina (Altier *et al.*, 2000). Las proteínas BarA de *Salmonella* y de *E. coli* comparten un 90% de identidad (Altier *et al.*, 2000).

El papel de SirA en la expresión de los genes de SPI-1 comenzó a ser estudiado cuando se encontró que en mutantes *sirA* se disminuye la expresión de *hilA* y, por lo tanto, se encuentran atenuadas en su capacidad de invadir células epiteliales y macrófagos, debido a la reducción de la expresión de genes de SPI-1 (Johnston *et al.*, 1996; Altier *et al.*, 2000). Además, la mutación en *sirA* disminuye la capacidad de *Salmonella* para provocar los signos de gastroenteritis, incluyendo la migración de neutrófilos y la secreción de flujo intestinal, en el modelo de asas intestinales ligadas de bovinos (Ahmer *et al.*, 1999). Así mismo, recientemente se reportó que mutantes *sirA* también se encuentran atenuadas en su capacidad para replicarse dentro del macrófago (Chan *et al.*, 2005).

Se ha reportado que SirA induce la transcripción de *hilA* y *hilC* al unirse directamente a sus regiones reguladoras, pero no puede unirse a las regiones reguladoras de *hilD* e *invF* (Johnston *et al.*, 1996; Teplitski *et al.*, 2003). Sin embargo,

recientemente se reportó que SirA se requiere también para la expresión óptima de *hilD* (Ellermeier *et al.*, 2005). Así mismo, se ha reportado que SirA puede inducir la expresión de *invF* por una vía independiente de HilA (Rakeman *et al.*, 1999). Así, a la fecha no es claro cómo SirA regula la expresión de *hilA*, *hilD*, *hilC* e *invF*; si induce directamente la expresión de cada uno de estos genes o si son regulados por un mecanismo en cascada de estos genes, donde SirA estaría regulando directamente sólo al gen que está al principio de ésta.

Por otro lado, recientemente se propuso la existencia de un circuito de regulación que controla la expresión de *hilA* y por lo tanto del regulón SPI-1. En este circuito están involucrados los reguladores HilC, HilD y RtsA (Ellermeier *et al.*, 2005).

Al igual que HilC y HilD, RtsA pertenece a la familia AraC/XylS de reguladores transcripcionales, pero a diferencia de ellos, se encuentra codificado fuera de las SPI's, dentro de un operón en el centisoma 93.9, que también codifica a RtsB. RtsB reprime la expresión de genes flagelares al unirse a la región promotora de *flhDC* (Ellermeier y Slauch, 2003).

Se ha reportado que RtsA, HilC y HilD se unen a la región de DNA corriente arriba de *hilA* para inducir su expresión (Schechter y Lee, 2001; Oleknovich y Kadner, 2002; Ellermeier y Slauch, 2003). Estos tres reguladores pueden inducir también la expresión de *invF* por una vía independiente de HilA, aunque a niveles más bajos que en la activación dependiente de HilA (Rakeman *et al.*, 1999; Akbar *et al.*, 2003; Ellermeier y Slauch, 2003).

Se ha propuesto que RtsA, HilC y HilD se autorregulan positivamente y cada uno es capaz de inducir de manera independiente la expresión de los otros dos reguladores. Aunque se ha demostrado que HilD parece tener un papel más importante en la expresión de RtsA, HilC, HilA y el propio HilD (Ellermeier *et al.*, 2005).

Lo anterior ha dificultado el esclarecer el mecanismo por el cual SirA induce la expresión de HilA, si lo hace directamente, o a través de HilD, HilC y RtsA.

Por otro lado, el grupo del Dr. José Luis Puente ha encontrado que, al igual que los genes de SPI-1, los genes de SPI-2 se expresan cuando se crece a *Salmonella* en el medio de cultivo LB, una condición que favorece la expresión de genes de SPI-1. Sin embargo, mientras que los genes de SPI-1 se expresan durante la fase exponencial de crecimiento, los genes de SPI-2 se expresan en la fase estacionaria tardía de crecimiento (Fig. 6).

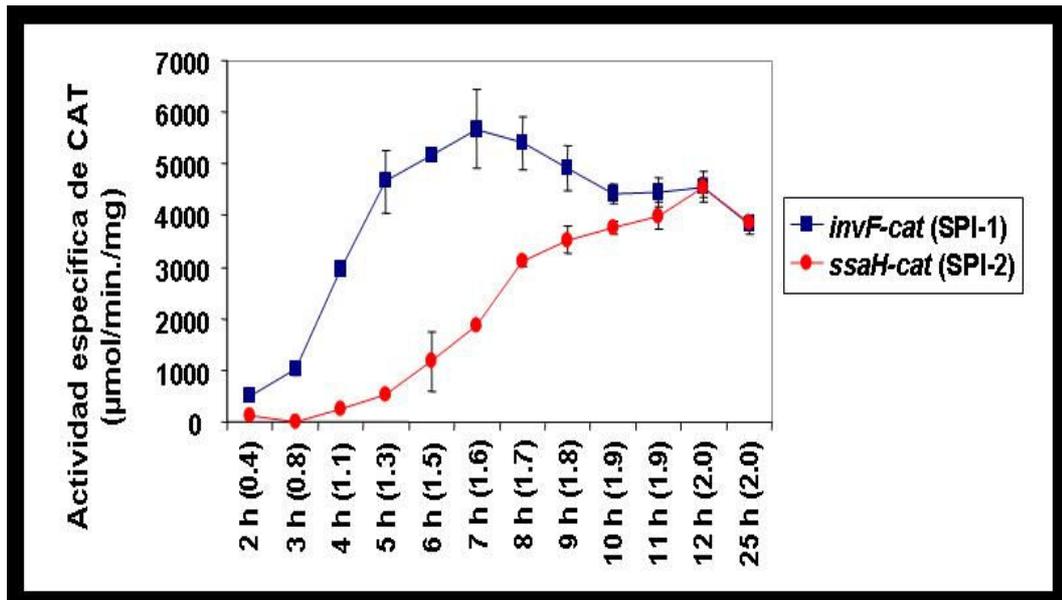


Fig. 6. Los genes de SPI-1 y SPI-2 se expresan en diferentes etapas de crecimiento en el medio LB. La expresión de las fusiones transcripcionales *invF-cat* (del regulón SPI-1) y *ssaH-cat* (del regulón SPI-2) se determinó de muestras tomadas cada hora durante un periodo de 12 horas, a partir de cultivos de *S. Typhimurium* SL1344 crecidos en medio de cultivo LB. La densidad óptica de los cultivos se indica entre paréntesis. La gráfica muestra los promedios y las desviaciones estándar de los resultados obtenidos en tres diferentes experimentos. (Bustamante *et al.*, datos no publicados)

De manera interesante, en estas condiciones de crecimiento, HilD y SirA no sólo regulan la expresión de genes de SPI-1, sino también se requieren para la expresión de genes de SPI-2 (Fig. 7). En contraste, HilA y SsrA/B sólo se requieren para inducir la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, respectivamente. Este hecho revela un mecanismo novedoso de “cross-talk” en la regulación genética entre ambas islas.

En este proyecto nos planteamos como objetivo central el esclarecer cómo SirA y HilD controlan la expresión de HilA, el regulador central de los genes de SPI-1, y la expresión de los genes de SPI-2. Tres hipótesis podrían explicar el efecto de estos reguladores sobre la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2. La primera es que SirA regule al regulador HilD y éste a su vez active la expresión de HilA y SsrA/B (Fig. 8A). La segunda es que, de manera inversa, el regulador HilD controle positivamente la expresión de SirA y éste a su vez active la expresión de HilA y SsrA/B (Fig. 8B). La tercera es que SirA y HilD actúen de manera conjunta para inducir la expresión de HilA y SsrA/B (Fig. 8C).

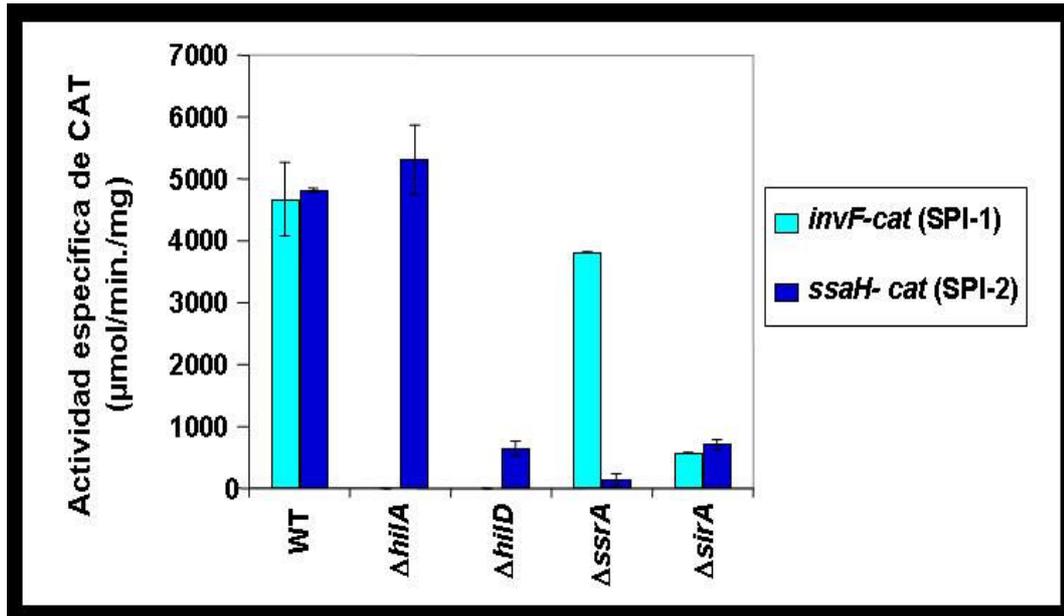


Fig. 7. SirA y HilD están involucrados en la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 en medio LB. La expresión de las fusiones transcripcionales *ssaH-cat* e *invF-cat* se analizó en la cepa silvestre SL1344 de *S. Typhimurium*, así como en sus derivadas mutantes $\Delta hilA::km$, $\Delta hilD::km$, $\Delta ssrA::km$ y *sirA::tet* (Tabla 3). La actividad específica de la enzima CAT, expresada por cada fusión, se determinó de muestras tomadas de cultivos crecidos en medio de cultivo LB a las 10 horas. Estos datos son representativos de tres experimentos realizados de manera independiente (Bustamante *et al.*, datos no publicados).

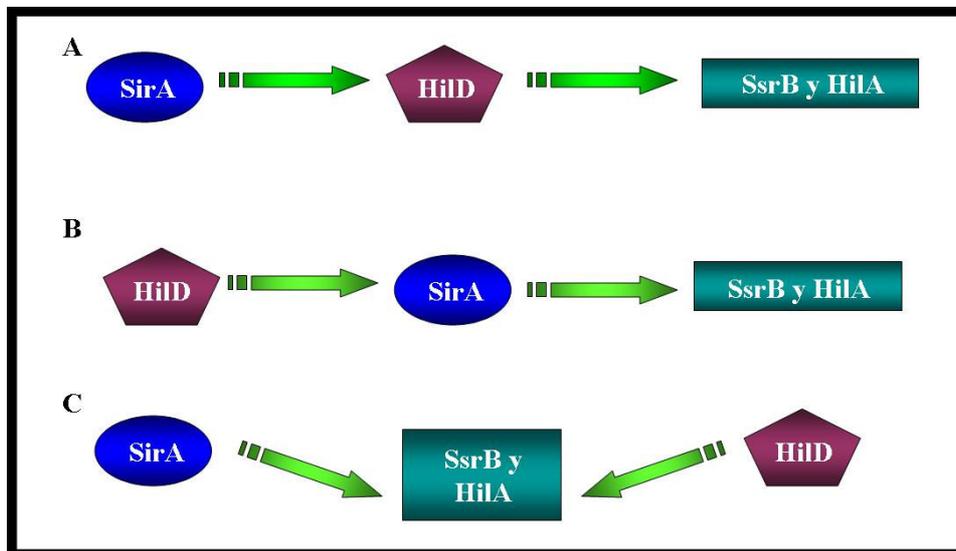


Fig. 8. Modelo que ilustra las tres alternativas por las que SirA y HilD controlarían a los reguladores principales de SPI-1 y SPI-2, HilA y SsrB, respectivamente.

❖ HIPÓTESIS

SirA controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 a través de la activación de HilD.

❖ OBJETIVO GENERAL

Definir los mecanismos moleculares que regulan la expresión de los genes de virulencia de *Salmonella*.

❖ OBJETIVO PARTICULAR

Esclarecer el mecanismo molecular por medio del cual SirA induce la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

❖ OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la expresión de *hilA*, *hilC*, *rtsA* y SsrB en presencia de sólo uno de los reguladores, SirA o HilD.
 2. Determinar la actividad transcripcional de *hilD*, *hilC* y *rtsA* en mutantes $\Delta sirA$, $\Delta hilD$, $\Delta hilC$ y $\Delta rtsA$.
 3. Evaluar el efecto en virulencia de la mutación $\Delta sirA$ en el modelo del ratón inoculado por vía intraperitoneal y oral.
-
-

3. METODOLOGÍA

- **Cepas bacterianas y medios de cultivo**

Las cepas y plásmidos empleados en este estudio se enlistan en las Tablas 3 y 4. Las cepas bacterianas fueron cultivadas en medio LB (Luria Bertani), que contiene por litro 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, pH7.5. Cuando se requirió, los medios de cultivo fueron suplementados con los antibióticos que se enlistan en la Tabla 5.

Tabla 3. Cepas bacterianas y plásmidos empleados en este trabajo

| Bacterias | Características | Origen o referencia |
|---|--|---|
| <u>S. Typhimurium:</u> WT $\Delta hilA::km$ $\Delta hilC::km$ $\Delta hilD::km$ $\Delta ompR::km$ $\Delta ssrB::km$ $sirA::tet$ $\Delta sirA::km$ $\Delta sirA$ $\Delta hilD$ $\Delta hilC$ $\Delta barA::km$ $\Delta rtsA::km$ $sirA$ -FLAG $hilC$ -FLAG $hilA$ -FLAG $hilD$ -FLAG $hilD$ -HA | Cepa silvestre SL1344, Str ^R Derivada de SL1344; $\Delta hilA::km$, Str ^R Km ^R Derivada de SL1344; $\Delta hilC::km$, Str ^R Km ^R Derivada de SL1344; $\Delta hilD::km$, Str ^R Km ^R Derivada de SL1344; $\Delta ompR::km$, Str ^R Km ^R Derivada de SL1344; $\Delta ssrB::km$, Str ^R Km ^R Derivada de SL1344; $sirA::Tn10$, Str ^R Tet ^R Derivada de SL1344; $\Delta sirA::km$, Str ^R Km ^R Derivada de $\Delta sirA::km$; $\Delta sirA$, Str ^R Derivada de $\Delta hilD::km$; $\Delta hilD$, Str ^R Derivada de $\Delta hilC::km$; $\Delta hilC$; Str ^R Derivada de SL1344; $\Delta barA::km$, Str ^R Km ^R Derivada de SL1344; $\Delta rtsA::km$; Str ^R Km ^R Derivada de SL1344; expresa la proteína SirA-FLAG Derivada de SL1344; expresa la proteína HilC-FLAG Derivada de SL1344; expresa la proteína HilA-FLAG Derivada de SL1344; expresa la proteína HilD-FLAG Derivada de SL1344; expresa la proteína HilD-HA | Hoiseth <i>et al.</i> , 1981 Bustmante <i>et al.</i> , no publicado “ “ “ “ “ Este trabajo Este trabajo |
| <u>E. coli:</u> MC4100 DH5 α DH10 β $\Delta uvrY::km$ | Cepa silvestre de laboratorio; Str ^R Cepa de laboratorio; NaI ^R Cepa de laboratorio; Str ^R Derivada de MC4100; $\Delta uvrY::km$, Str ^R Km ^R | Casadaban, 1976 Invitrogen Invitrogen Este trabajo |
| Plásmidos pKK232-8 pHilA-cat1 pHilC-cat1 | Derivado de pBR322, contiene el gen <i>cat</i> (cloranfenicol acetil transferasa) sin promotor; Amp ^R Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilA-cat</i> , que lleva la región -410 a +446, con respecto al sitio de inicio de transcripción de <i>hilA</i> . Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilC-cat</i> , que lleva la región -373 a +79, con respecto al sitio de inicio de transcripción de <i>hilC</i> . | Pharmacia LKB Biotechnology Este trabajo Este trabajo |

| | | |
|-------------|--|--------------------------------|
| pHilD-cat1 | Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilD-cat</i> , que lleva la región -364 a +88, con respecto al inicio de transcripción de <i>hilD</i> . | Este trabajo |
| pSirA-cat1 | Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>sirA-cat</i> , que lleva la región -563 a +98, con respecto al sitio de inicio de la traducción de <i>sirA</i> . | Este trabajo |
| pRtsA-cat1 | Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>rtsA-cat</i> , que lleva la región -465 a +97, con respecto al inicio de traducción de <i>rtsA</i> . | Este trabajo |
| pMPM-T3 | Vector de clonación de bajo número de copias; origen P15A; Tet ^R | Mayer, 1995 |
| pMPM-K3 | Vector de clonación de bajo número de copias; origen P15A; Km ^R | Mayer, 1995 |
| pT3HilD1 | Derivado de pMPM-T3; contiene el gen estructural <i>hilD</i> y el sitio de unión a ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> . | Este trabajo |
| pT3SirA1 | Derivado de pMPM-T3; contiene el gen estructural <i>sirA</i> y el sitio de unión a ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> . | Este trabajo |
| pK3HilD1 | Derivado de pMPM-K3; contiene el gen estructural <i>hilD</i> y el sitio de unión a ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> . | Este trabajo |
| pK3SirA1 | Derivado de pMPM-K3; contiene el gen estructural <i>sirA</i> y el sitio de unión a ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> . | Este trabajo |
| pBADMycHisA | Vector de expresión, contiene el promotor de arabinosa y la secuencia que codifica polihistidinas y el epítipo Myc | Invitrogen |
| pBADHilD1 | Derivado de pBADMycHisA, contiene el gen estructural <i>hilD</i> , bajo el control del promotor <i>ara</i> . | Este trabajo |
| pBADSirA1 | Derivado de pBADMycHisA, contiene el gen estructural <i>sirA</i> , bajo el control del promotor <i>ara</i> . | Este trabajo |
| pKD4 | Derivado de pANTS γ ; contiene el gen de resistencia a Km, flanqueado por FRT's. | Datsenko y Wanner, 2000 |
| pKD46 | Derivado de pINT-ts, contiene el promotor de arabinosa y el sistema de recombinación del fago λ Rojito; Amp ^R | Datsenko y Wanner, 2000 |
| pCP20 | Plásmido de replicación termo-sensible e inducción térmica de la síntesis de la recombinasa FLP . | Cherepanov y Wackernagel, 1995 |
| pSUB11 | Derivado de pGP704, contiene el gen de resistencia a kanamicina y la secuencia completa del epítipo 3xFLAG | Uzzau <i>et al.</i> , 2001 |
| pSU315 | Derivado de pGP704, contiene el gen de resistencia a kanamicina y la secuencia completa del epítipo hemaglutinina (HA) del virus de la influenza | Uzzau <i>et al.</i> , 2001 |

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

| Nombre | Secuencia | Tm | Modificación |
|---|---|----|-----------------|
| Construcción de la fusión <i>hilA-cat</i> | | | |
| HilA-F | 5' - ATC <u>GGA TCC</u> CTC TGA GAA CTA TTT GC -3' | 58 | <i>Bam</i> HI |
| HilA-R | 5' - GAC <u>AAG CTT</u> TTC TGA GCG TAG CAG GG -3' | 62 | <i>Hind</i> III |
| Construcción de la fusión <i>hilD-cat</i> | | | |
| HilD-R | 5' -CTG <u>AAG CTT</u> ATC TGC GGC AGG ACG C- 3' | 58 | <i>Hind</i> III |
| HilD-R | 5' -AAT <u>GGA TCC</u> TCA CAG CCG TTC AGT GAG- 3' | 60 | <i>Bam</i> HI |
| Construcción de la fusión <i>hilC-cat</i> | | | |
| HilC-R | 5' -GGC <u>TGT CGA</u> CGG TGA TTA TTG CTA ATG GC- 3' | 56 | <i>Sal</i> I |
| HilC-F | 5' -ACC <u>CCC GGG</u> ATG CAG GAG ATT ATT TTA TC- 3' | 60 | <i>Sma</i> I |
| Construcción de la fusión <i>sirA-cat</i> | | | |
| SirA-F | 5' -GCC <u>GGA TCC</u> ATC GCC TGC AGC ATC AGC- 3' | 66 | <i>Bam</i> HI |
| SirA-R | 5' -AGC <u>AAG CTT</u> CAC CGA CAA CTT TAA TGC- 3' | 64 | <i>Hind</i> III |
| Construcción de la fusión <i>rtsA-cat</i> | | | |
| RtsABam-F | 5' -CAA <u>GGA TCC</u> GGA TAT GCG TAC ACC GTC- 3' | 66 | <i>Bam</i> HI |
| RtsAHind-R | 5' -CCC <u>AAG CTT</u> GAT AAG GAT TTC CTC TGC CAG- 3' | 64 | <i>Hind</i> III |
| Construcción de plásmidos pK3HilD1 y pT3HilD1 | | | |
| HilDF-T3 | 5' - TTT <u>GTC GAC</u> AGG ATA CCA GTA AGG AAC AT -3' | 56 | <i>Bam</i> HI |
| HilDR-T3 | 5' - GTA TAA GCT <u>GGG ATC</u> CGG ACA GAA C -3' | 66 | <i>Sal</i> I |
| Construcción de plásmidos pK3SirA1 y pT3SirA1 y caracterización de la mutante Δ<i>sirA</i> | | | |
| SirAF-T3 | 5' -CAT <u>AAG CTT</u> CAA AAA CGA GAG CAA AAT CG- 3' | 60 | <i>Hind</i> III |
| SirAR-T3 | 5' -TAA <u>GGA TCC</u> GTA CCG CCG GCG TCA TAC- 3' | 60 | <i>Bam</i> HI |
| Construcción de plásmido pBADSirA1 | | | |
| SirAHisA-F | 5' -TTA <u>GAT CTA</u> TCA ACG TTC TTC TTG TTG ATG- 3' | 60 | <i>Bg</i> II |
| SirAHisA-R | 5' -TTT <u>AAG CTT</u> CTG GCT TGT TAA CGT CTC CG- 3' | 62 | <i>Hind</i> III |
| Construcción de plásmido pBADHilD1 | | | |
| HilDexF | 5' - GAT <u>GGA TCC</u> GAA AAT GTA ACC TTT GTA AGT AAT AG -3' | | <i>Bam</i> HI |
| HilDmyr | 5' - AAA <u>GAA TTC</u> ATG GTT CGC CAT TTT TAT G -3' | | <i>Eco</i> RI |
| Construcción de la mutante Δ<i>sirA::km</i> | | | |
| SirAH1P1 | 5'- TAT TCT GGA GAT ATT CCT TTG ATC AAC GTT CTT CTT GTT GAT <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u> -3' | 64 | PS1 |
| SirAH2P2 | 5'- TAA CGT CTC CGC ATT ACA CAG GCC ATG GCG GAT TGC CAG GTG <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u> -3' | 54 | PS2 |
| Caracterización de la mutante Δ<i>sirA::km</i> y de la cepa <i>sirA-FLAG</i> | | | |
| SirA-F | 5'- GCC <u>GGA TCC</u> ATC GCC TGC AGC ATC AGC -3' | 66 | <i>Bam</i> HI |
| SirA-R | 5'- AGC <u>AAG CTT</u> CAC CGA CAA CTT TAA TGC -3' | 64 | <i>Hind</i> III |

Construcción de la mutante $\Delta barA::km$

| | | | |
|----------|--|----|-----|
| BarAH1P1 | 5'- CCA TAA CGG AAC TCC ATG ACC AAC TAC AGC CTG CGC GCA CGC <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u> -3' | 64 | PS1 |
| BarAH2P2 | 5'- CGC CAT CCG GCG AAT ATC AGC CTA ATA TCT TCT TCG CTT CAC <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u> -3' | 54 | PS2 |

Caracterización de la mutante $\Delta barA::km$

| | | | |
|----------|--|----|--------------|
| BarAF-T3 | 5'- TGA <u>CTC GAG</u> CGG TTA TGA TCT GAC GCG TC -3' | 62 | <i>XhoI</i> |
| BarAR-T3 | 5'- GAA <u>GGA TCC</u> GAG TGA AAA CGT ACG AAT GAC -3' | 60 | <i>BamHI</i> |

Construcción de la mutante $\Delta uvrY::km$

| | | | |
|----------|--|----|-----|
| UvrYH1P1 | 5'- ATT TCT GGA GAT ATT CCT TTG ATC AAC GTT CTA CTT GTT GAT <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u> -3' | 64 | PS1 |
| UvrYH2P2 | 5'- TAA TGT CTC CGC ATT ACA CAG ACC ATG GCG AAT TGC CAG GTG <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u> -3' | 54 | PS2 |

Caracterización de la mutante $\Delta uvrY::km$

| | | | |
|----------|--|----|----------------|
| UvrYF-T3 | 5'- GGT <u>AAG CTT</u> TTG GTG ACG GGC GTG ACC -3' | 60 | <i>HindIII</i> |
| UvrYR-T3 | 5'- ATA <u>GGG ATC</u> CGT ACC ACC AGC ATC GTA CAT G -3' | 64 | <i>BamHI</i> |

Construcción de la mutante $\Delta rtsA::km$

| | | | |
|----------|--|----|-----|
| RtsAH1P1 | 5'- TAA TAA AAG GAA ATT ATC ATG CTA AAA GTA TTT AAT CCC TCA <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u> -3' | 64 | PS1 |
| RtsAH2P2 | 5'- TTG ATG ACG AGA GGA AGA TAA AAA CGC TAA AAA TTC CGA TGG <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u> -3' | 54 | PS2 |

Caracterización de la mutante $\Delta rtsA::km$ y de la cepa *rtsA*-FLAG

| | | | |
|--------|-----------------------------------|----|--|
| RtsA-F | 5'- TCG CCA CCT GAT ACC TTA AG-3' | 60 | |
| RtsA-R | 5'- ACA GAT AAT CCT GCT GCC AC-3' | 60 | |

Caracterización de las mutantes $\Delta sirA::km$, $\Delta barA::km$ y $\Delta uvrY::km$ **Caracterización de las cepas *hilA*-FLAG, *hild*-FLAG, *hild*-HA, *invF*-FLAG, *rtsA*-FLAG y *sirA*-FLAG**

| | |
|----|------------------------------------|
| K1 | 5'- CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT -3' |
| K2 | 5'- CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC -3' |

Etiquetado del gen *sirA* con epítipo FLAG

| | | | |
|------------|--|----|------|
| SirAFlag-F | 5'-CGC CAT GGC CTG TGT AAT GCG GAG ACG TTA ACA AGC CAG <u>GAC TAC AAA GAC CAT GAC GGT</u> -3' | 62 | Flag |
| SirAFlag-R | 5'- TAA CGG TTT TCA AAA ACG CCT TTG CGT CAA ATA TTT CAC <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AGT TC</u> -3' | 54 | Flag |

Etiquetado del gen *hilD* con epítipo FLAG

| | | | |
|------------|---|----|------|
| HilDFlag-F | 5' - TTT AAA ACT ACG CCA TCG ACA TTC ATA AAA ATG GCG AAC CAT <u>GAC TAC AAA GAC CAT GAC GGT</u> -3' | 62 | Flag |
| HilDFlag-R | 5' - TTT TAA TAA AAA TCT TTA CTT AAG TGA CAG ATA CAA AAA ATG <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AGT TC</u> -3' | 54 | Flag |

Etiquetado del gen *hilD* con epítipo HA

| | | | |
|------------|--|----|------|
| HilDHA-F | 5' - TTT AAA ACT ACG CCA TCG ACA TTC ATA AAA ATG GCG AAC CAT <u>TAT CCG TAT GAT GTT CCT GAT TAT</u> -3' | 64 | HA |
| HilDFlag-R | 5' - TTT TAA TAA AAA TCT TTA CTT AAG TGA CAG ATA CAA AAA ATG <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AGT TC</u> -3' | 54 | Flag |

Caracterización de las cepas *hilD*-FLAG y *hilD*-HA

| | | | |
|--------|--------------------------------------|----|--|
| HilD-F | 5' - AAA CTT GCA GAA GAA GGT ACC -3' | 60 | |
| HilD-R | 5' - AAT AAG GCA ATA TCG TTT TAC -3' | 60 | |

Etiquetado del gen *invF* con epítipo FLAG

| | | | |
|------------|---|----|------|
| InvFFlag-F | 5' - CCG CGG AAA TTA TCA AAT ATT ATT CAA TTG GCA GAC AAA <u>GAC TAC AAA GAC CAT GAC GGT</u> -3' | 60 | Flag |
| InvFFlag-R | 5' - CGG CAC ATG CCA GCA CTC TGG CCA AAA GAA TAT GTG TCT <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AGT TC</u> -3' | 62 | Flag |

Caracterización de la cepa *invF*-FLAG

| | | | |
|--------|-------------------------------------|----|-----------------|
| InvF-F | 5' - TAA GGT ACT GGC GCT GTT AC -3' | 60 | <i>Hind</i> III |
| InvF-R | 5' - TGC TAA CAA TGA CAG GCT CC -3' | 60 | <i>Bam</i> HI |

Etiquetado del gen *rtsA* con epítipo FLAG

| | | | |
|------------|---|----|------|
| RtsAFlag-F | 5' - TTA GCG TTT TTA TCT TCC TCT CGT CAT CAA TAT GTT AAT <u>GAC TAC AAA GAC CAT GAC GGT</u> -3' | 62 | Flag |
| RtsAFlag-R | 5' - TAT GTT TTG CTT TGT TCT TAT ACT GCA TTG TCA GAT ATC <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AGT TC</u> -3' | 62 | Flag |

Etiquetado del gen *hilA* con epítipo FLAG

| | | | |
|------------|---|----|------|
| HilAFlag-F | 5' - AAA AGA TGG AAA CAG GAT CCC CGC TTG ATT AAA TTA CGG <u>GAC TAC AAA GAC CAT GAC GGT</u> -3' | 62 | Flag |
| HilAFlag-R | 5' - CGA TGA TAA AAA AAT AAT GCA TAT CTC CTC TCT CAG ATT <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AGT TC</u> -3' | 62 | Flag |

Caracterización de la cepa *hilA*-FLAG

| | | | |
|-----------|--------------------------------------|----|--|
| HilAcar-F | 5' - GGC TGG AAT CTT TTC ATG GC -3' | 60 | |
| HilAcar-R | 5' - TCA GCC TTT TCA TAT GGA AGC -3' | 60 | |

T_m: temperatura de alineamiento, en grados centígrados. La modificación se indica subrayada en la secuencia

Tabla 5. Antibióticos y dosis empleadas en este trabajo

| | |
|------------------------|-----------|
| Ampicilina (Amp) | 200 µg/ml |
| Estreptomicina (Str) | 100 µg/ml |
| Kanamicina (Km) | 20 µg/ml |
| Ácido Nalidíxico (Nal) | 15 µg/ml |
| Tetraciclina (Tet) | 10 µg/ml |

- **Construcción de plásmidos que expresan fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* y plásmidos que expresan a SirA o HilD**

Para la construcción de los diversos plásmidos empleados en este estudio (Tabla 3), primeramente se amplificaron mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) los fragmentos de los genes de interés, que serían clonados en los diferentes vectores.

Para la construcción de los plásmidos que expresan las fusiones transcripcionales de los promotores de los genes *hilA*, *hilD*, *hilC*, *rtsA* y *sirA*, se amplificaron sus regiones reguladoras, empleando oligonucleótidos que introducen sitios de restricción. En la figura 9 se indican las regiones de cada gen que fueron amplificadas y empleadas para la construcción de las fusiones. Los productos de PCR se clonaron en el vector pKK232-8, que contiene al gen reportero *cat* sin promotor.

Para la construcción de los plásmidos que expresan a SirA o HilD a partir de un promotor constitutivo, un fragmento de 877 pb para *sirA* y un fragmento de 1121 pb para *hilD*, fueron clonados en los plásmidos pMPM-T3 y pMPM-K3, que tienen el origen de replicación P15A. Para el caso de *sirA*, este fragmento incluye el gen estructural más 129 pb corriente arriba del codón de inicio y 90 pb corriente abajo del codón de término. Para *hilD*, el fragmento incluye el gen estructural *hilD* más 54 pb corriente arriba del codón de inicio y 136 pb corriente abajo del codón de término.

Finalmente, para la construcción de los plásmidos que expresan a SirA o HilD a partir del promotor *araBAD* inducible, los genes *sirA* y *hilD* se clonaron en el plásmido pBADMyHis(A). Para *sirA*, se amplificó un fragmento de 667 pb que incluye el gen estructural más 5 pb corriente arriba del codón de inicio y 6 pb corriente abajo del codón de término. Para *hilD*, se amplificó un fragmento de 942 pb que incluye el gen estructural más 6 pb corriente arriba del codón de inicio y 6 pb corriente abajo del codón de término.

Los oligonucleótidos empleados en cada caso, así como el sitio de restricción que introducen, se muestran en la Tabla 3. Para verificar el tamaño del producto de PCR, se corrió un gel de agarosa (BIORAD) al 1%, con amortiguador TAE (Tris-Acetatos-EDTA 0.5X, pH 8.0) a un voltaje de 80-100 V. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y se visualizó en un transiluminador con luz UV de onda corta (Alphaimager). Los productos de PCR fueron purificados con los estuches “Gene Clean” (BIO-101) o “PCR Purification Kit” (Qiagen) y digeridos con las enzimas correspondientes (Tabla 4). Después, el ADN digerido fue precipitado con butanol para su posterior ligación en el plásmido correspondiente. Las ligaciones fueron precipitadas con glicógeno y transformadas en las cepas de *E. coli* DH5α o DH10β.

En todos los casos, para verificar que la clonación fue correcta, se purificaron plásmidos de las transformantes de *E. coli* DH5 α o *E. coli* DH10 β , los cuales fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%. Además, estos plásmidos fueron digeridos empleando las enzimas con las que se clonaron para corroborar el tamaño del inserto.

Se seleccionaron los plásmidos que llevaran el inserto correcto y se purificaron con el kit comercial “High pure plasmid isolation” de Roche. Posteriormente fueron enviados a la unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología para obtener y verificar la secuencia de nucleótidos.

De esta manera se obtuvieron los plásmidos pHilA-cat1, pHilD-cat1, pHilC-cat1, pRtsA-cat1 y pSirA-cat1 (Tabla 3) que contienen las fusiones transcripcionales de los genes *hilA*, *hilD*, *hilC*, *rtsA* y *sirA*, respectivamente. Los plásmidos construidos se transformaron mediante electroporación en las cepas WT, $\Delta hilA::km$, $\Delta hilC::km$, $\Delta hilD::km$, $\Delta rtsA::km$, $\Delta ompR::km$, $\Delta sssB::km$ y *sirA::Tet* de *S. Typhimurium* y la cepa *E. coli* MC4100 (WT). Las cepas empleadas se describen en la Tabla 3.

Los plásmidos que expresan a SirA y HilD bajo un promotor constitutivo, fueron nombrados pT3SirA1, pK3SirA1, pT3HilD1 y pK3HilD1. En el caso de los plásmidos pT3SirA1 y pT3HilD1, éstos fueron transformados en la cepa $\Delta hilD::km$ que contiene la fusión *hilA-cat*, mientras que los plásmidos pK3SirA1 y pK3HilD1 fueron transformados en la cepa mutante *sirA::tet* que contiene la fusión *hilA-cat*. Además, los 4 plásmidos construidos fueron transformados por separado en las cepas mutantes $\Delta hilD$ y $\Delta sirA$ que contienen la fusión *hilA-cat*. Por otro lado, los cuatro plásmidos fueron transformados en las cepas silvestres de *E. coli* que contienen las fusiones *hilA-cat hilC-cat*, *hilD-cat* y *rtsA-cat*. Así mismo, los plásmidos pT3HilD1 y pT3SirA1 se transformaron en las cepas $\Delta uvrY::km$ de *E. coli* que contienen estas mismas fusiones. Las cepas empleadas se describen en la Tabla 3.

Los plásmidos que expresan a SirA o HilD a partir de un promotor inducible con arabinosa, fueron nombrados pBADSirA1 y pBADHilD1. Ambos fueron transformados por separado en las cepas $\Delta hilD$ y $\Delta sirA$. Las cepas empleadas se describen en la Tabla 3.

En todos los casos, las transformaciones fueron sembradas en cajas con medio LB adicionadas con el antibiótico necesario en cada caso para realizar la selección de colonias transformantes. Para comprobar que las células se transformaron adecuadamente, los plásmidos transformados fueron purificados a partir de las bacterias transformantes mediante miniprep y posteriormente fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%.

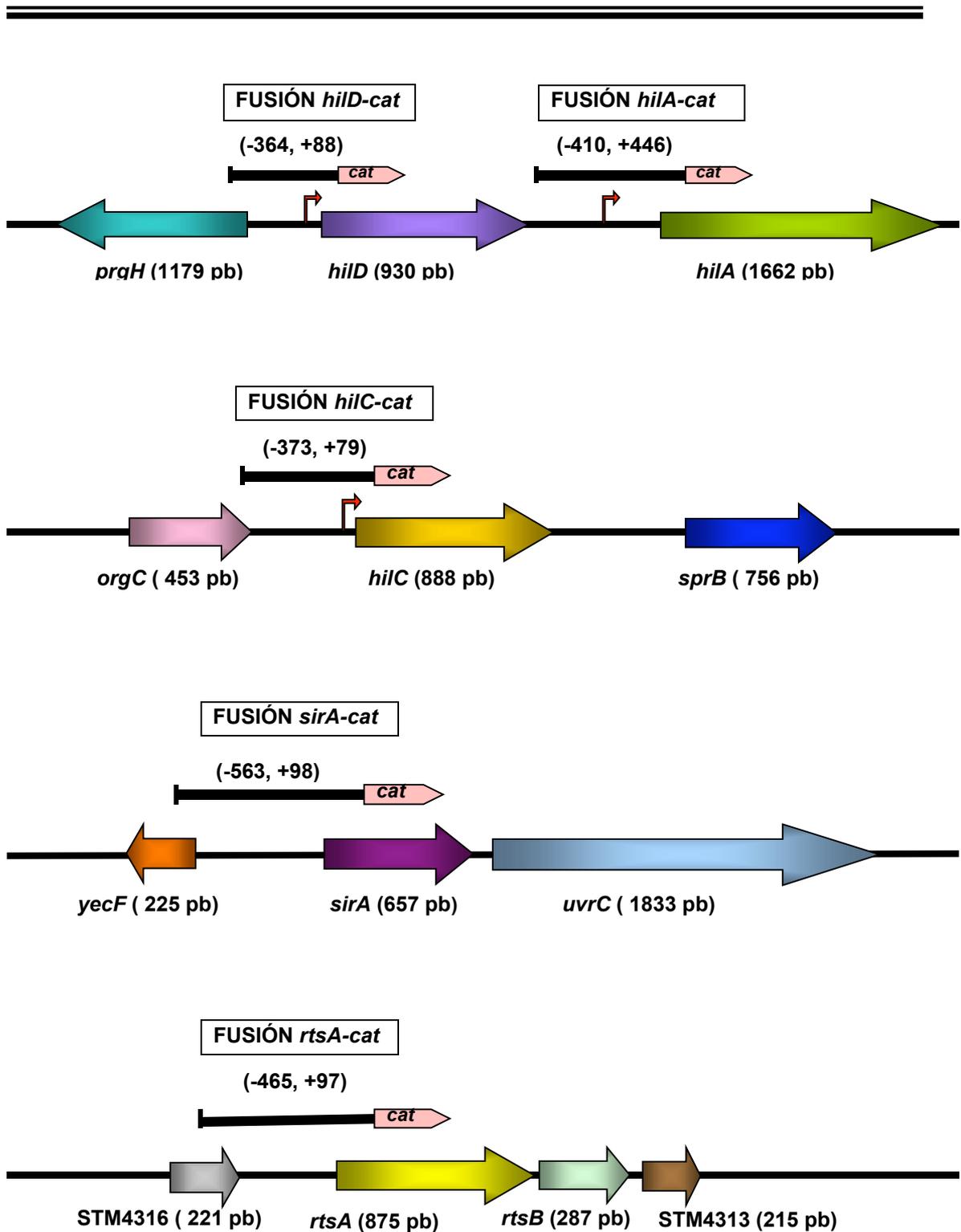


Fig. 9. Representación esquemática de las fusiones transcripcionales de los genes *hilA*, *hilC*, *hilD* y *sirA* al gen reportero *cat*. Se indican las posiciones que abarca la región reguladora contenida en las fusiones de *hilA*, *hilC* y *hilD*, respecto del sitio de inicio de transcripción. Para el caso de *sirA* y *rtsA*, se indica el número de pares de bases corriente arriba y corriente abajo del sitio de inicio de traducción. Los números entre paréntesis indican la longitud en pares de bases, que tiene cada gen dentro del cromosoma de *S. Typhimurium* LT2.

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

Las cepas que contienen los plásmidos que llevan las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* se cultivaron en 50 ml de medio LB adicionado con los antibióticos adecuados. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación a 120 rpm durante toda la noche.

Los cultivos crecidos toda la noche se ajustaron a una $DO_{600nm}=1.0$ y 1ml de esta suspensión bacteriana se inoculó por duplicado en matraces con 50 ml de LB adicionado con los antibióticos adecuados. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm.

A las 5 horas de crecimiento se determinó la DO_{600nm} de los cultivos y se tomaron muestras de 1.5 ml de cada cultivo en un tubo eppendorf. Estas muestras se centrifugaron 2 min a 12000 rpm. El sobrenadante se desechó y se agregaron 800 μ l de buffer TDTT (Tris-HCl-pH 7.8 50mM-Dithiotreitol 30 μ M). Se centrifugó de nuevo a 12000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante.

Las pastillas bacterianas se resuspendieron en 1ml de buffer TDTT y se sonicaron durante 3 min en un sonicador “Vibra Cell” (Sonics and Materials, Inc), con pulsos de 9.9 s. y reposo de 9.9 s. entre cada pulso. Posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf nuevos.

Para cuantificar las proteínas totales, 10 μ l del extracto se colocaron por duplicado en una placa de 96 pozos (Costar). Se agregaron 200 μ l de una mezcla de reacción del estuche para cuantificación de proteínas “BCA Protein Assay Reagent” de Pierce. Las placas se incubaron durante 30 min a 37°C y posteriormente se determinó la concentración de proteínas mediante la lectura de absorbancia a 562 nm en un lector automatizado de barrido para microplacas tipo CERES 900-C (Bio-Tek Instruments Inc) y el software KC3TM. Las lecturas obtenidas se extrapolaron a una curva estándar de concentración de proteínas en μ g / μ l, previamente leída y almacenada en el programa KC3.

La expresión de CAT se determinó colocando por duplicado 5 μ l de cada extracto en una placa de 96 pozos. Se agregaron 200 μ l de una solución que contiene Tris-HCl pH 7.8 0.1M, DTNB 1mM (ácido 5,5’ ditiono-bis (2-nitrobenzoico), Research Organics, Inc), cloranfenicol 0.1 mM (Sigma) y acetil Co-A 0.1 mM (Pharmacia Biotech). Posteriormente se determinó la cinética de expresión de CAT mediante la lectura de absorbancia a 410 nm en el mismo lector automatizado para microplacas, a intervalos de 5 s durante 5 min, posicionado en el modo de cinética.

Se utilizó una curva estándar (0 a 2500 U/ml) de actividad de la enzima CAT previamente leída y almacenada en el programa KC3, para interpolar las actividades de

cada muestra. La actividad específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) se obtuvo al dividir las unidades de CAT entre la concentración de proteínas totales para cada extracto.

“Western blot” para detectar la proteína SsrB y las proteínas etiquetadas con epítipo FLAG o HA

Las cepas a estudiar se cultivaron en medio LB de la misma manera que la referida para el ensayo de expresión de fusiones transcripcionales.

Para detectar a SsrB, a las 10 horas de crecimiento se determinó la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ y se transfirió 1 ml de cada matraz, a un tubo eppendorf. Para detectar las proteínas HilA-FLAG, HilC-FLAG, SirA-FLAG, HilD-FLAG y HilD-HA, lo anterior se realizó a las 5 horas de crecimiento. Las muestras se centrifugaron 3 min a 12000 rpm. Se desechó el sobrenadante y las pastillas fueron resuspendidas en 500 μl de buffer de carga SDS-PAGE1X. Se calentaron a 92°C durante 5 min y se visualizó el extracto de proteínas totales en un gel de poliacrilamida.

Otro gel de los mismos extractos de proteínas se utilizó para la transferencia de éstas a una membrana de nitrocelulosa. Para esto, se recortó el gel, así como dos pares de 3 cuadros (6 cuadros) de papel y 1 cuadro de membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel. El gel y la membrana recortados se colocaron en buffer de transferencia durante 10 min. Los cuadros de papel filtro fueron introducidos en el buffer también, pero justo antes de la transferencia.

Para transferir el gel, se colocó todo en la cámara de transferencia en el siguiente orden:

papel filtro (3)

Membrana

Gel

Papel filtro (3)

Se transfirió a 15 volts durante 45 – 60 minutos.

Después de la transferencia el gel fue teñido con azul de Coomasie para comprobar que las proteínas se transfirieron a la membrana. A ésta se le agregó solución bloqueadora (PBST y leche) y se dejó bloqueando en agitación durante toda la noche.

Al otro día se agregó solución bloqueadora que contenía el anticuerpo primario (anti-SsrB 1:10000, anti-FLAG 1:10000, anti-HA 1:2500 o anti-DNAK 1:50000) a la membrana y se mantuvo en agitación durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se lavó la membrana con PBST en agitación durante 15 minutos y posteriormente se realizaron dos lavados más con PBST durante 5 min cada uno.

Se agregó después solución bloqueadora que contenía el anticuerpo secundario; se utiliza anticuerpo anti-conejo (1:10000) conjugado con la enzima HRP para detectar al anticuerpo anti-SsrB y anticuerpo anti-ratón (1:10000) para detectar a DnaK y a los anticuerpos anti-FLAG y anti-HA. Las membranas se mantuvieron en agitación durante una hora. Se realizaron de nuevo tres lavados durante 15, 5 y 5 min respectivamente, con PBST en agitación.

Posteriormente se agregó una mezcla 1:1 de los reactivos para revelado “enhanced luminol reagent” y “oxidizing reagent” del kit para revelado de Perkin Elmer Life Sciences y se mantuvieron en agitación durante un 1 min.

La membrana se envolvió en plástico, se pegó en un cassette para revelado y se expuso a una película radiográfica durante 10 min. Posteriormente se colocó en solución reveladora durante 2 min, se enjuagó con agua y finalmente se colocó en solución fijadora durante 2 min.

Perfil de secreción de proteínas

Las cepas a estudiar se cultivaron en medio LB de la misma manera que la referida para el ensayo de expresión de fusiones transcripcionales y “western blot”.

A las 10 horas de crecimiento se determinó la DO_{600nm} y se transfirieron 1.5 ml de cada matraz, a 4 tubos eppendorf. Estas muestras se centrifugaron 5 min a 14000 rpm.

Posteriormente se transfirieron 1.3 ml del sobrenadante a tubos nuevos, se les agregaron 145 μ l de ácido tricloro acético al 100% y se dejaron precipitando así durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se centrifugaron durante 30 min a 14 000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas se disolvieron en 25 μ l de buffer de carga SDS-PAGE 1X. Se agregaron 2 μ l de Tris saturado a cada tubo y las 4 muestras de cada cepa se concentraron en un solo tubo.

Las muestras concentradas se calentaron a 92°C durante 5 min y fueron visualizadas en un gel de poliacrilamida.

Determinación de los índices de competencia (IC) de las cepas WT y $\Delta sirA$ de *S. Typhimurium*

Se preparó un inóculo de 5 ml en medio LB de las cepas a probar (mutante y silvestre), y se incubó toda la noche a 37°C en agitación (con los antibióticos para los cuales sea resistente).

Al otro día se transfirieron los 5 ml del inóculo a un matraz con 40 ml de LB y se incubaron durante 5-6 horas en agitación a 37°C. Se cosecharon las bacterias en tubos Nalgene.

Se centrifugó a 7000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 30 ml de PBS 1x. Se centrifugó a 7000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 2 ml de PBS 1x la pastilla de células.

Se diluyeron 10 μ l de la suspensión bacteriana en 10 ml de PBS 1x y se ajustó a una DO_{540nm} de 0.6, lo que equivale aproximadamente a 1×10^8 bacterias/ml.

Una vez ajustada la suspensión bacteriana, se diluyó 1:10 con PBS 1x. Esta suspensión equivale a 1×10^7 bacterias/ml. De la misma manera, se hicieron diluciones

seriadas 1:10 para obtener 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 y 1×10^0 bacterias/ml.

Se determinaron las unidades formadoras de colonia (UFC) de las diluciones 1×10^2 , 1×10^1 y 1×10^0 . Para esto se sembró por duplicado 1 ml de cada dilución en cajas petri estériles, adicionando después 15-20 ml de medio LB 0.8% a cada caja. Se adicionó también el antibiótico para el cual es resistente la cepa. Como control se sembró una caja con 1 ml de PBS 1x.

Una vez solidificadas, las cajas se incubaron a 37°C durante 36-72 h. Se contaron las UFC de cada caja, y con esto se obtuvo el promedio y el número de UFC/ml de la suspensión bacteriana inicial que estaba ajustada a 0.6.

Se hizo una mezcla de las bacterias mutante y silvestre en proporción 1:1. Para la vía oral (VO) el inóculo contenía 5×10^3 bacterias de cada cepa (para el caso de la cepa *S. Typhimurium* SL1344, la inoculación de 5×10^5 produjo la muerte de las ratonas en 48 horas). Para la vía intraperitoneal (VIP) el inóculo contenía 5×10^2 bacterias de cada cepa (para el caso de la cepa *S. Typhimurium* SL1344, la inoculación de 5×10^3 produjo la muerte de las ratonas en 48 horas). El volumen total de la mezcla de bacterias a inocular, fue de 200 μl -400 μl .

Para la identificación de las ratonas se realizaron muescas y/o perforaciones en el cartílago de las orejas. Se administraron 100 μl de bicarbonato de sodio 1% por vía oral (VO) a las ratonas y posteriormente se les retiró el agua de bebida durante 30 min. Se inoculó un grupo de ratonas con la dosis de 5×10^3 bacterias por VO y otro grupo de ratonas con la dosis de 5×10^2 bacterias, por VIP.

La obtención de órganos se realizó, para el caso de las ratonas inoculadas por VIP, a los 3 días post-inoculación. En aquellas ratonas inoculadas por VO, la obtención se realizó a los 6 días post-inoculación.

Se obtuvo el peso de los tubos eppendorf vacíos que fueron utilizados para colocar los órganos extraídos.

Las ratonas fueron sacrificadas mediante el uso de una cámara cerrada con CO_2 (hielo seco + agua). Una vez hecho lo anterior, se colocaron en decúbito dorsal y se humedeció el vientre con alcohol con el fin de facilitar la apertura de la cavidad. Mediante el uso de material quirúrgico estéril, se realizó una incisión por línea media, que va desde el ano hasta la cavidad torácica.

Los órganos que se extrajeron fueron el hígado y el bazo; estos fueron colocados en los tubos eppendorf vacíos. Se obtuvo el peso de los tubos, que ahora contenían los órganos extraídos, y tomando en cuenta el peso de los tubos vacíos, se obtuvo por diferencia, el peso de los órganos extraídos.

Los órganos fueron colocados en cajas Petri marcadas previamente, mismas que contenían 5 ml de PBS 1x y fueron macerados mediante el uso de un trozo de organza estéril de aproximadamente 10 cm x 5 cm, y el émbolo de una jeringa estéril.

Una vez macerados los órganos, se tomaron 2 ml del material obtenido y se colocaron en un tubo con 2 ml de deoxicolato de sodio al 1%, previamente preparado y esterilizado por filtración. (Esta mezcla correspondió a la dilución 10^0).

Se transfirieron 2 ml de la mezcla anterior, a otro tubo con 8 ml de PBS 1x. (Esta mezcla correspondió a la dilución 10^{-1}). Se transfirió 1 ml de la mezcla a un tubo con 9 ml de PBS 1x (esta mezcla correspondió a la dilución 10^{-2}). De esta misma manera se realizaron diluciones hasta conseguir la dilución 10^{-4} para el caso de la VIP y de 10^{-6} para el caso de la VO.

Se sembró por duplicado 1 ml de cada dilución en cajas de petri estériles, adicionando 15-20 ml de LB al 0.8% de agar a cada caja. Una vez solidificadas se incubaron durante 36-72 horas a 37 °C. Como control se sembró 1 ml de PBS 1x estéril.

Se cuantificaron las UFC de cada caja, se obtuvo el promedio y el número de UFC por mg de órgano. Los índices de competencia se obtuvieron al calcular la relación entre las cepas mutante y silvestre que fueron inoculadas (“input”), dividida por la relación que se obtiene de las dos cepas recuperadas de los órganos (“output”).

$$IC = \frac{\frac{\text{Output mutante}}{\text{Output silvestre}}}{\frac{\text{Input mutante}}{\text{Input silvestre}}}$$

Construcción de las cepas mutantes $\Delta sirA::km$, $\Delta uvrY::km$, $\Delta barA::km$ y $\Delta rtsA::km$

La mutagénesis se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner; 2000). La estrategia general se basó en reemplazar los genes *sirA*, *barA*, *rtsA* y *uvrY* con un gen seleccionable de resistencia a kanamicina que es generado por PCR utilizando oligonucleótidos que tienen 36 nucleótidos homólogos al gen que se desea remover. En este procedimiento, la recombinación requiere la recombinasa del fago λ Rojo, la cual es sintetizada bajo el control de un promotor inducible en un plásmido de bajo número de copia (pKD46). A continuación se describe la técnica.

Se transformó el plásmido pKD46 mediante electroporación en la cepa WT SL1344 de *S. Typhimurium* (para las mutantes en *barA*, *rtsA* y *sirA*) o en la cepa MC4100 de *E. coli* (para la mutante *uvrY*) y se cultivaron en cajas con medio LB adicionado con ampicilina durante toda la noche a 30°C.

Posteriormente se inocularon de 20 a 40 colonias en 25 ml de medio SOB adicionado con 25 μ l de Ampicilina y 2.5 ml de L-+-arabinosa 1M. Esta mezcla se incubó a 30°C en agitación, hasta obtener una DO_{600nm} de 0.6 (3 a 5 horas).

Las células se centrifugaron durante 10 min a 8000 rpm a 4°C. Se resuspendió la pastilla de células en 1 ml de agua fría. Se transfirió a tubos eppendorf y se centrifugó durante 5 min a 8000 rpm a 4°C. Se realizaron dos lavados más con 1 ml de agua fría. Finalmente la pastilla de células fue resuspendida en 100 μ l de agua fría.

Por otra parte, se amplificó mediante PCR el gen de resistencia a antibiótico (Kanamicina) a partir del plásmido pKD4 empleando los oligonucleótidos que proveen la región homóloga a los genes de interés, *sirA*, *barA*, *rtsA* o *uvrY* (Tabla 4).

Para la reacción de PCR, en un volumen de reacción de 100 μ l, se adicionaron 1 μ l de ADN (pKD4), 1 μ l de los oligonucleótidos a una concentración de 25 μ M (Tabla 4), 16 μ l de una mezcla de dNTP's 1.25 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, New England Biolabs), 10 μ l de amortiguador 10X, 5 μ l de MgCl₂ 50 mM, 0.5 μ l de enzima pfu y 0.5 μ l de enzima Taq polimerasa Expand High Fidelity (3.5 U/l, Roche), aforados a 100 μ l con agua desionizada estéril. Las condiciones de esta reacción fueron las siguientes:

| | | |
|--------------------|----------------------|-------------|
| Desnaturalización: | 94°C 5 min – 1 ciclo | |
| Desnaturalización: | 94°C 1 min | } 30 ciclos |
| Alineamiento: | 60°C 1 min | |
| Extensión: | 70°C 1' min | } 30 s |
| Extensión: | 70°C 3 min – 1 ciclo | |

Los productos de PCR fueron precipitados agregando 100 μ l de acetato de amonio pH 7.8, 300 μ l de fenol y 300 μ l de cloroformo alcohol isoamílico. Esta mezcla se centrifugó durante 5 min a 14000 rpm. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se agregaron 500 μ l de cloroformo alcohol isoamílico. Después de centrifugar durante 5 min a 14000 rpm, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se agregó 1 ml de alcohol al 100% y se dejaron precipitando durante toda la noche a -20°C o bien a -70°C durante 1 hora. Al otro día (o transcurrida la hora), se centrifugaron durante 30 min a 14000 rpm. Posteriormente se desechó el etanol y se realizó un lavado con 1 ml de etanol al 70%. Después de centrifugar durante 10 min a 14000 rpm y desechar el sobrenadante, se secaron durante 15 min con calor medio y se resuspendieron en 16 μ l de agua.

De 3 a 6 μ l del producto de PCR fueron transformados en 50 μ l de las células electrocompetentes (*S. Typhimurium* SL1344/pKD46 o *E. coli* MC4100/pKD46).

Las transformaciones se crecieron en 1 ml de medio SOC durante 3 horas a 30°C. Posteriormente se sembraron 200 μ l en medio LB adicionado con kanamicina y se incubaron a 37°C durante toda la noche. El resto se guardó a temperatura ambiente.

Las transformantes que se obtuvieron, se resembraron en medio LB adicionado con Km a 37°C con el fin de separar colonias. Posteriormente se sembraron en medio LB adicionado con estreptomicina, kanamicina y ampicilina con el fin de analizar las resistencias y sensibilidades hacia los antibióticos.

Para la caracterización de las mutantes, con aquellas colonias que fueron resistentes a kanamicina y sensibles a ampicilina se realizaron distintas PCR's con varios juegos de oligonucleótidos (Tabla 4) que amplifican regiones del gen de resistencia a kanamicina y/o las regiones que lo flanquean.

Para realizar la PCR, las colonias candidatas se resuspendieron en 75 μ l de agua, se calentaron durante 10 min a 90°C y se centrifugaron durante 10 min. Se usaron 10 μ l del sobrenadante como template para el PCR.

Etiquetado de los genes *sirA*, *hilD*, *invF*, *hila* y *rtsA* con el epítipo FLAG o HA

Este procedimiento es una modificación de la mutagénesis descrita por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner; 2000) y consiste en agregar en fase un epítipo al final de uno o más genes de interés en el cromosoma bacteriano. La expresión de la proteína de interés fusionada a dicho epítipo permite el análisis de su expresión utilizando anticuerpos específicos para el epítipo.

Un fragmento de ADN que incluye la secuencia que codifica el epítipo y un marcador seleccionable, es amplificado por PCR utilizando un oligonucleótido de 36 nucleótidos homólogos a la última porción del gen que se desea etiquetar, antes del codón de paro, y un oligonucleótido del mismo tamaño que es homólogo a la región del gen localizada después del codón de paro.

La transformación de una cepa que expresa las funciones del bacteriófago lambda red (es decir, contiene el plásmido pKD46) produce recombinantes que llevan el gen de interés fusionado a la secuencia que codifica el epítipo. La proteína resultante, etiquetada en el extremo C-terminal, puede ser identificada entonces por técnicas estándar de inmunodetección, utilizando anticuerpos comerciales (Uzzau *et al.*, 2001).

Para el etiquetado, primeramente se amplificó mediante PCR el epítipo FLAG o el epítipo HA (Hemaglutinina) y el gen de resistencia a antibiótico (Km) usando como template de ADN los plásmidos pSUB11 (para FLAG) o pSU315 (para HA) y empleando los oligonucleótidos que proveen la región homóloga al gen de interés (Tabla 4). Las condiciones para esta reacción, así como el resto de la técnica, son los mismos que se describieron anteriormente para la construcción de las mutantes.

Eliminación del casete de resistencia a kanamicina de las mutantes construidas y de las cepas etiquetadas con los epítipos FLAG o HA

Con esta técnica, el gen de resistencia que se insertó en las cepas mutantes o etiquetadas, es eliminado empleando un plásmido que expresa la recombinasa FLP, la cual reconoce directos repetidos FRT (“FLP recognition targets”) que flanquean el gen de resistencia insertado. De esta manera, al llevarse a cabo la recombinación entre estos sitios, se pierde el cassette de resistencia.

Las cepas de interés (mutantes o etiquetadas), fueron transformadas con el plásmido pCP20, el cual es un plásmido Ap^R y Cm^R que tiene replicación sensible a temperatura e inducción térmica de la síntesis de la recombinasa FLP.

Después de la transformación, las bacterias se cultivaron en 1 ml de medio SOC durante 3 horas a 30°C. Posteriormente se sembraron 200 µl en medio LB adicionado con ampicilina y se incubaron a 30°C durante toda la noche.

Aquellas colonias resistentes a ampicilina fueron crecidas nuevamente en LB adicionado con estreptomycin y ampicilina a 30°C con el fin de separar las colonias. Posteriormente, fueron seleccionadas dos veces a 42°C en LB adicionado únicamente con estreptomycin, lo que permite que se exprese la recombinasa (por lo tanto se pierda el casete de antibiótico) y que a su vez se pierda el plásmido pCP20.

Finalmente las colonias bacterianas se replicaron en medio LB adicionado con estreptomicina, kanamicina y ampicilina con el fin de analizar las resistencias y sensibilidades hacia los antibióticos.

Las colonias que fueron resistentes a estreptomicina y sensibles a ampicilina y kanamicina, se caracterizaron por PCR's con varios juegos de oligonucleótidos (Tabla 4), que amplifican regiones del gen de resistencia a kanamicina y/o las regiones que lo flanquean.

Para realizar la PCR, las colonias candidatas se resuspendieron en 75 μ l de agua, se calentaron durante 10 min a 90°C y se centrifugaron durante 10 min. Se usaron 10 μ l del sobrenadante como plantilla para la PCR.

4. RESULTADOS

- **Construcción de cepas mutantes y plásmidos recombinantes.**

Durante la realización de este estudio se construyeron varias cepas mutantes de *S. Typhimurium* y *E. coli*, las cuales se generaron al remover, y reemplazar por un casete de kanamicina, los genes *sirA*, *barA*, *rtsA* o *uvrY* (Tabla 3). A estas cepas mutantes se les removió posteriormente el casete de kanamicina, obteniéndose de esta manera dos versiones de cada mutante, una que lleva el casete de kanamicina y otra sin casete. Para la generación de todas estas cepas mutantes se utilizó la técnica de mutagénesis descrita por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000), como se describe en metodología.

Además, se construyeron plásmidos que contienen fusiones transcripcionales de los genes *hilA*, *hilD*, *hilC*, *rtsA* y *sirA* (Tabla 3), los cuales se obtuvieron al clonar las regiones reguladoras de estos genes en el plásmido pKK232-8, que contiene el gen reportero *cat* sin promotor. En la figura 9 se indica la organización de los genes estudiados, así como las regiones reguladoras que se fusionaron al gen reportero *cat*.

Así mismo, se obtuvieron plásmidos que expresan a HilD o SirA a partir de un promotor constitutivo y plásmidos que expresan a estos reguladores a partir del promotor *araBAD*, el cual se induce en presencia de arabinosa (Tabla 3).

- **SirA y HilD se requieren para la expresión de *hilA*.**

Se ha reportado que la expresión de *hilA*, y como consecuencia la expresión de la mayoría de genes de SPI-1, se controla por un mecanismo complejo de regulación que involucra reguladores específicos de *Salmonella* y otros reguladores globales (Johnston *et al.*, 1996; Eichelberg *et al.*, 1999; Schechter *et al.*, 1999) (Fig. 5). Sin embargo, aún no es claro cómo todos estos reguladores se coordinan para regular la expresión de *hilA*. Además, el papel de algunos de estos reguladores es controversial, ya que su efecto puede observarse únicamente cuando se sobre-expresan.

Con el propósito de contribuir al esclarecimiento de los mecanismos que regulan la expresión de los genes de SPI-1, analizamos la expresión de una fusión transcripcional *hilA-cat* en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en diferentes mutantes que carecen de alguno de los genes que codifican para reguladores de la expresión de *hilA*. Para esto, el plásmido pHilA-cat1, que contiene la fusión *hilA-cat*, se transformó en las cepas mutantes *sirA::tet*, $\Delta hilD::km$, $\Delta hilC::km$, $\Delta rtsA::km$, $\Delta hilA::km$, $\Delta ompR::km$ y $\Delta ssrB::km$ y se determinó la actividad específica de CAT de las transformantes, a partir de muestras de cultivos crecidos en LB durante 5 horas.

En la figura 10 se muestra que los niveles de expresión de *hilA-cat* disminuyeron drásticamente en las mutantes *sirA::tet* y $\Delta hilD::km$, con respecto a su expresión en la cepa silvestre, lo cual es consistente con estudios previos que han mostrado que SirA y

HilD regulan positivamente la expresión de *hilA* (Johnston *et al.*, 1996; Eichelberg *et al.*, 1999; Schechter *et al.*, 1999; Oleknovich and Kadner, 2004). En contraste, la expresión de la fusión *hilA-cat* no se afectó en las cepas mutantes $\Delta hilC::km$, $\Delta rtsA::km$, $\Delta ompR::km$ y $\Delta ssrB::km$ (Fig. 10), lo que indica que en las condiciones de crecimiento evaluadas los reguladores HilC, RtsA, OmpR y SsrB no se requieren para la expresión de *hilA*.

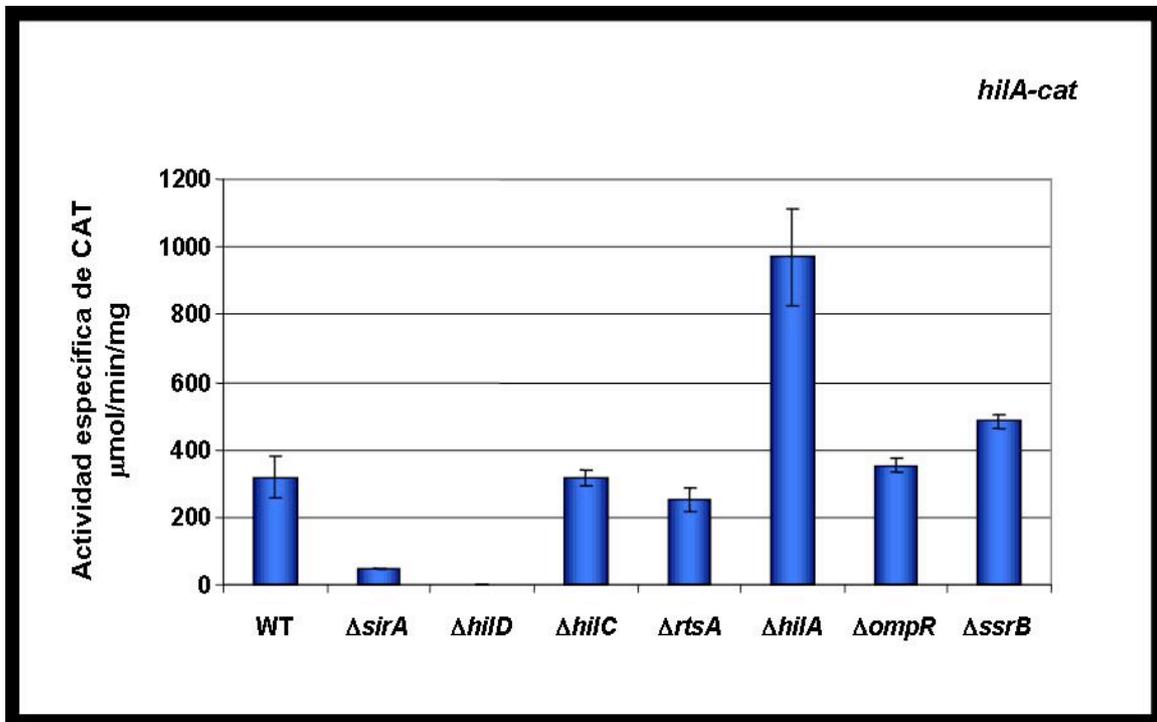


Fig. 10. SirA y HilD son requeridos para la expresión de *hilA*. El plásmido pHilA-cat1 que contiene la fusión transcripcional *hilA-cat* se transformó en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* SL1344 y en sus derivadas mutantes *sirA::tet*, $\Delta hilD::km$, $\Delta hilC::km$, $\Delta rtsA::km$, $\Delta hilA::km$, $\Delta ompR::km$ y $\Delta ssrB::km$. La actividad específica de la enzima CAT (cloranfenicol acetil transferasa), expresada por cada cepa, se determinó de muestras de cultivos que se tomaron a las 5 horas de crecimiento en medio LB (Luria-Bertani) en agitación, a 37°C. Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes.

A este respecto, para el caso de los reguladores HilC y RtsA, se ha reportado que éstos incrementan la expresión de *hilA* cuando se sobre-expresan (Ellermeier *et al.*, 2005). Por otro lado, estudios previos han mostrado que los reguladores OmpR y SsrB se requieren para la expresión de los genes de SPI-2 (Feng *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2004).

La expresión de la fusión *hilA-cat* aumentó alrededor de tres veces en la mutante $\Delta hilA::km$, con respecto a su nivel de expresión en la cepa silvestre (Fig. 10), lo que indica que HilA se autoregula negativamente. Este resultado es consistente con un estudio reciente en el que se reporta que HilA es capaz de reprimir su propia expresión (De Keersmaecker *et al.*, 2005).

Así, estos resultados muestran que SirA y HilD son los reguladores que presentan un papel más claro en la inducción de la expresión de *hilA*.

-
-
- **HilD regula directamente la expresión de *hilA*, mientras que el efecto de SirA sobre la expresión de *hilA* es en cascada, al regular positivamente la expresión de *hilD*.**

Para definir de qué manera SirA y HilD controlan la expresión de *hilA*, es decir, si ambos reguladores actúan directamente sobre la región reguladora de *hilA*, o si tienen un efecto en cascada al regularse positivamente uno al otro, se analizó la expresión de la fusión *hilA-cat* en las cepas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta hilD$, en presencia de plásmidos que expresan a HilD o SirA bajo un promotor constitutivo. Para esto, los plásmidos pK3HilD1 y pK3SirA1 se transformaron en las cepas $\Delta sirA$ y $\Delta hilD$ que contienen el plásmido pHilA-cat1. Posteriormente, se determinó la actividad específica de la enzima CAT de las transformantes, a partir de muestras de cultivos crecidos en LB durante 5 horas.

Como se muestra en la figura 11, en la cepa $\Delta hilD$ que contiene el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3SirA1, que expresa SirA, no se detectó expresión de la fusión *hilA-cat*, mientras que en la que contiene el plásmido que expresa HilD (pK3HilD1), la expresión de la fusión *hilA-cat* se incrementó incluso a un nivel mayor que su expresión en la cepa silvestre.

Por otro lado, en la cepa $\Delta sirA$ que contiene el vector pMPM-K3 la expresión de la fusión *hilA-cat* disminuyó más de 2 veces, con respecto a su expresión en la cepa silvestre (Fig. 11). Sin embargo, la presencia de los plásmidos que expresan SirA o HilD restauraron la expresión de la fusión *hilA-cat* en la mutante $\Delta sirA$, a niveles mayores que su expresión en la cepa silvestre.

En conjunto, los resultados anteriores indican que SirA no puede inducir la expresión de *hilA* en ausencia de HilD, mientras que HilD sí es capaz de inducir la expresión de *hilA* en ausencia de SirA.

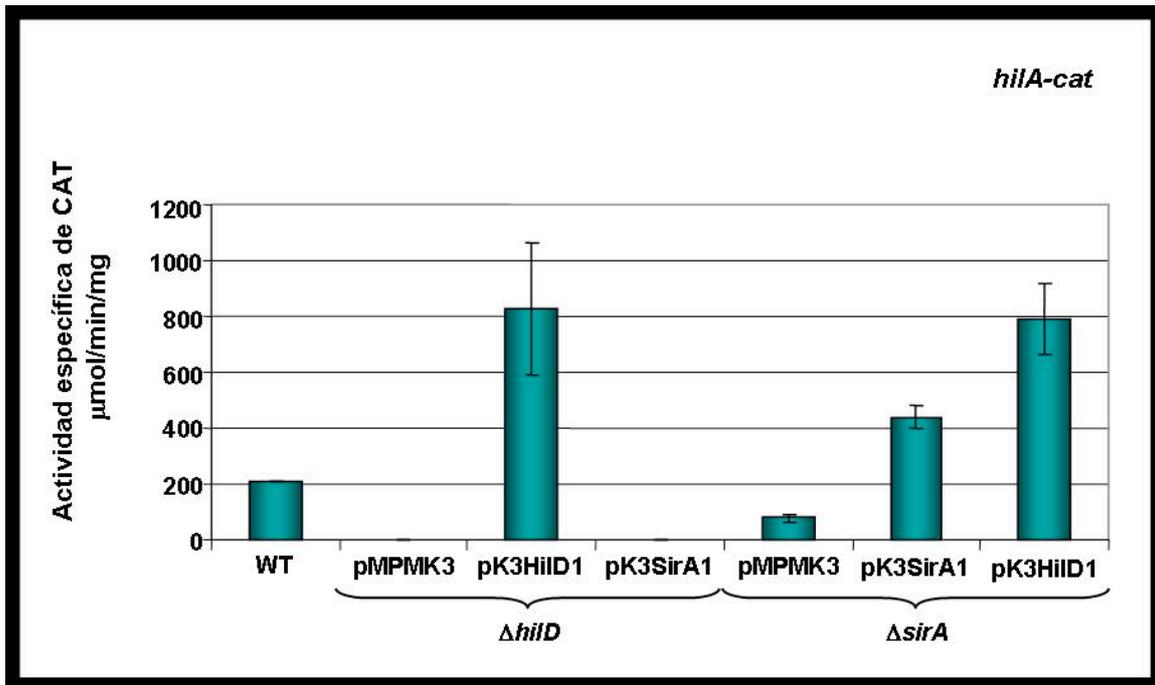


Fig. 11. HilD puede inducir directamente la expresión de *hila* en ausencia de SirA. Plásmidos derivados del vector pMPM-K3, que expresan a SirA (pK3SirA1) o a HilD (pK3HilD1) a partir del promotor *lac*, fueron transformados en las cepas mutantes $\Delta hilD$ y $\Delta sirA$ que contienen el plásmido pHilA-cat1 que expresa la fusión *hila-cat*. Las cepas transformadas se cultivaron en medio LB (Luria-Bertani) en agitación a 37°C. La expresión de la fusión *hila-cat* en estas cepas, así como en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* SL1344, fue determinada mediante la cuantificación de la actividad específica de la enzima CAT (cloranfenicol acetil transferasa) a partir de muestras que se tomaron a las 5 horas de crecimiento. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Como una forma de corroborar los resultados anteriores, pensamos realizar un experimento similar al descrito en la figura 11 pero ahora detectando directamente la expresión del regulador HilA. Al no contar con anticuerpos anti-HilA, optamos por utilizar una estrategia que permite marcar a las proteínas con un epítipo conocido en el extremo carboxilo terminal y para el cual se cuenta con anticuerpos comerciales. De esta manera, el gen cromosomal *hila* en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* se fusionó en fase con la secuencia que codifica para el epítipo FLAG de la manera descrita en la sección de metodología, de tal forma que se exprese la proteína de fusión HilA-FLAG, que puede ser detectada con anticuerpos anti-FLAG. En la figura 12 se muestra que el regulador HilA-FLAG se detectó claramente como una banda de 65.7 KDa, el tamaño esperado para esta proteína. Además, mediante el análisis del perfil de secreción de proteínas de esta cepa (dato no mostrado), comprobamos que el epítipo FLAG no afecta la funcionalidad de HilA. Actualmente se está etiquetando a la proteína HilA en las cepas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta hilD$ para realizar el experimento que tenemos planeado.

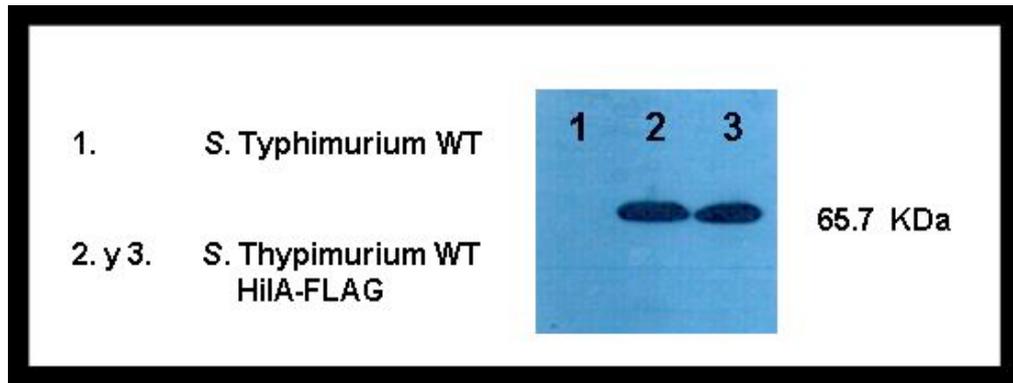


Fig. 12. Inmunodetección de HilA-FLAG. La expresión de HilA-FLAG en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* SL1344, fue analizada mediante “western immunoblot” utilizando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo FLAG. Los extractos de proteínas totales fueron obtenidos de muestras de cultivos bacterianos crecidos en medio LB (Luria-Bertani) en agitación durante 5 horas.

HilA es el regulador central de los genes de SPI-1, pues controla la expresión de los genes que codifican para el SSTT, así como la de los genes que codifican para las proteínas que se secretan por este sistema (Bajaj *et al.*, 1995). Como alternativa para corroborar la existencia de la cascada de regulación formada por SirA y HilD sobre la expresión de *hilA*, se analizaron los perfiles de secreción de proteínas de las cepas mutantes $\Delta hilD$ y $\Delta sirA$ transformadas con los plásmidos pBADHilD1 o pBADSirA1, que expresan a HilD o SirA, respectivamente, bajo control del promotor *araBAD*, el cual se induce en presencia de arabinosa. Los perfiles de secreción se obtuvieron de cultivos crecidos en LB durante 9 horas.

Como se muestra en la figura 13, en el perfil de proteínas secretadas de la cepa silvestre de *Salmonella* se detectan principalmente las proteínas SipA, SipB y SipC, proteínas efectoras codificadas dentro de SPI-1, que se secretan por el SSTT codificado en esta misma isla. Así mismo, se detecta una proteína abundante que corresponde a la proteína del flagelo, FliC. La expresión de esta proteína no está bajo el control de los reguladores de los genes de SPI-1 y su secreción es dependiente del SSTT flagelar.

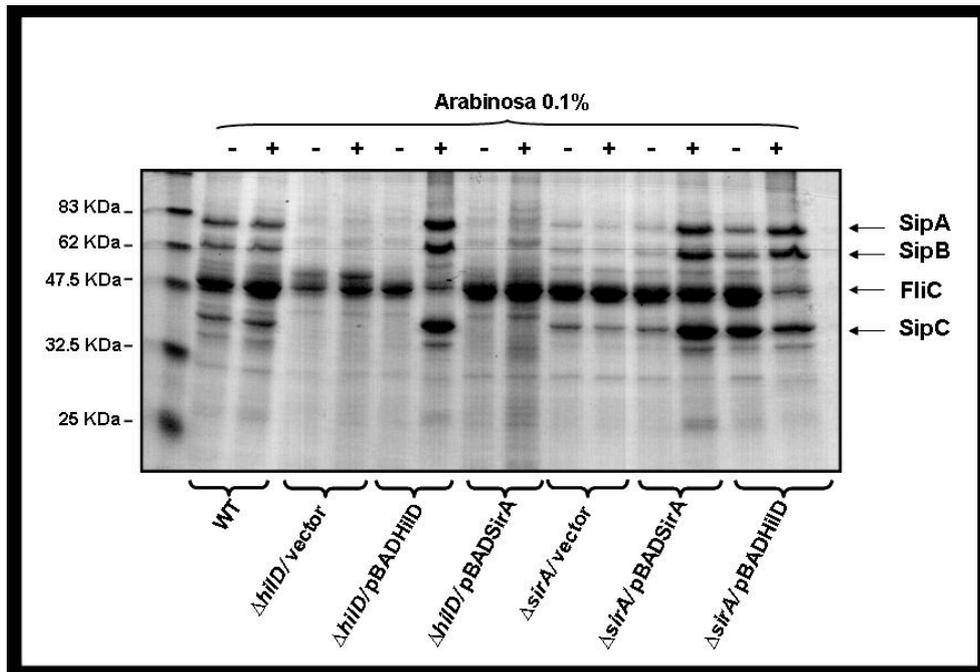


Fig. 13. HilD es capaz de restaurar la expresión y secreción de proteínas codificadas por SPI-1 en una mutante *sirA* de *S. Typhimurium*. El perfil de secreción de proteínas fue analizado a partir de extractos de proteínas secretadas en las cepas $\Delta hilD$ y $\Delta sirA$ que contienen plásmidos que expresan a HilD (pBADHilD1) o SirA (pBADSirA1) a partir de un promotor inducible con arabinosa. Se analizaron muestras de cultivos crecidos en el medio de cultivo LB (Luria-Bertani) en agitación durante 10 horas. La inducción se realizó con 0.1% de arabinosa. Las proteínas SipA, SipB y SipC son proteínas secretadas mediante el SSTT de SPI-1. La proteína FliC es una proteína del flagelo; su secreción y su regulación son independientes del SSTT de SPI-1. En la figura se muestran datos representativos de tres experimentos independientes.

En la cepa mutante $\Delta hilD$ que contiene el vector pBADMyHisA, no se detectaron las proteínas SipA, SipB y SipC en los perfiles de proteínas secretadas. Asimismo, en la cepa $\Delta sirA$ disminuyó drásticamente la secreción de dichas proteínas en comparación con el perfil de secreción observado en la cepa silvestre (Fig. 13). La presencia del plásmido que expresa HilD (pBADHilD1) restauró la secreción de estas proteínas efectoras tanto en la mutante $\Delta hilD$ como en la $\Delta sirA$, detectándose a un nivel mayor que en la cepa silvestre (Fig. 13). De manera interesante, en la mutante $\Delta sirA$ se restauró el perfil de proteínas secretadas aún sin la inducción con arabinosa (Fig. 13), lo cual se discutirá posteriormente. Por otro lado, la presencia del plásmido que expresa SirA (pBADSirA1) restauró la secreción de SipA, SipB y SipC en la cepa mutante $\Delta sirA$ pero no en la mutante $\Delta hilD$ (Fig. 13).

Así, en conjunto, los resultados anteriores indican que HilD induce directamente la expresión de *hila*, mientras que el efecto de SirA sobre la expresión de *hila* parece ser en cascada, al regular positivamente la expresión de *hilD*.

- **HilD no requiere de otro regulador específico de *Salmonella* para inducir la expresión de *hila*.**

Para determinar si HilD actúa solo o junto con otro regulador presente en *Salmonella* para inducir la expresión de *hila*, se evaluó la expresión de la fusión *hila-cat* en la cepa silvestre de *E. coli* MC4100 transformada con el plásmido que expresa a HilD o SirA (pK3HilD1 o pK3SirA1, respectivamente) bajo un promotor constitutivo.

En la cepa de *E. coli* que contiene el vector pMPM-K3 o el plásmido que expresa SirA (pK3SirA1), la fusión *hila-cat* se expresó aproximadamente 5 veces menos que en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* (Fig. 14, panel superior). La presencia del plásmido que expresa HilD (pK3HilD1) indujo la expresión de la fusión *hila-cat* en *E. coli*, a un nivel 4 veces mayor que su expresión en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* (Fig. 14, panel superior).

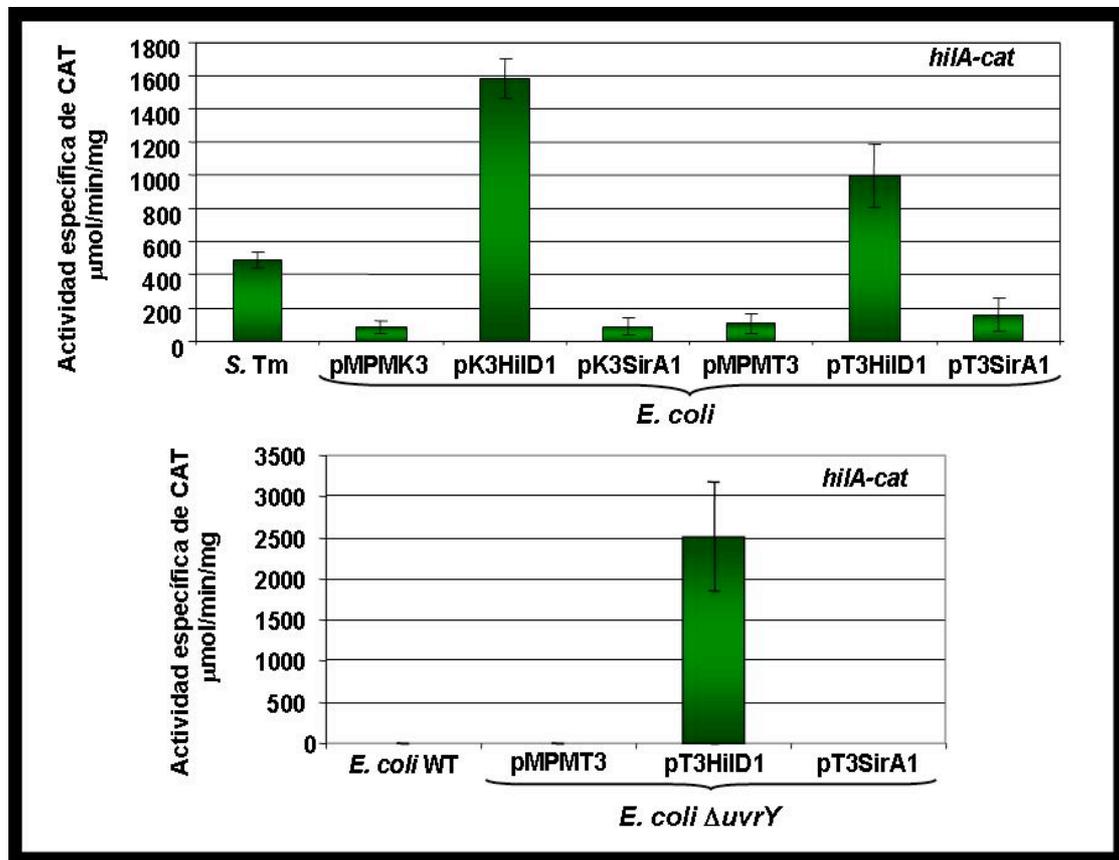


Fig. 14. HilD no requiere de SirA para inducir la expresión de *hila* en *E. coli*. La expresión de la fusión *hila-cat* fue analizada en la cepa de *E. coli* MC4100 (panel superior) y en su derivada mutante $\Delta uvrY::km$ (panel inferior) en presencia de plásmidos que expresan a HilD (pT3HilD1 o pK3HilD1) o a SirA (pT3SirA1 o pK3SirA1). Estos plásmidos son derivados de los vectores pMPM-K3 (km^r) o pMPM-T3 (tet^r), que contienen el promotor *lac*. La actividad específica de la enzima CAT (cloranfenicol acetil transferasa) se determinó de muestras de cultivos a las 5 horas de crecimiento en medio LB (Luria-Bertani) a 37°C. Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes.

La presencia de UvrY en *E. coli*, que presenta 96% de identidad con SirA de *Salmonella* (Johnston *et al.*, 1996), planteaba la posibilidad de que este regulador tuviera un efecto en la inducción de la expresión de la fusión *hila-cat* en *E. coli*,

mediada por HilD. Para analizar esto, se realizó un experimento similar al anterior, analizando la expresión de la fusión en la cepa $\Delta uvrY::km$ de *E. coli* (Fig. 14, panel inferior).

En este caso, debido a la resistencia de la mutante construida, se emplearon los plásmidos pT3HilD1 y pT3SirA1, derivados del vector pMPM-T3, que expresan a HilD y SirA, respectivamente. Estos plásmidos también fueron evaluados en la cepa *E. coli* MC4100, obteniéndose resultados semejantes a los obtenidos con los plásmidos derivados del vector pMPM-K3 (Fig. 14, panel superior).

Como se muestra en el panel inferior de la figura 14, en la cepa *E. coli* $\Delta uvrY::km$ la expresión de *hilA-cat* fue inducida en presencia del plásmido que expresa HilD (pT3HilD1), pero no en presencia de los plásmidos pMPM-T3 o pT3SirA1.

Estos resultados corroboran que HilD regula directamente la expresión de *hilA*. Además, indican que HilD no requiere de otro regulador de *Salmonella* para inducir la expresión de *hilA*.

- **SirA modula positivamente la expresión de *hilD*.**

Los resultados anteriores sugieren que SirA regula positivamente la expresión de *hilD*. Para comprobar esto, el plásmido pHilD-cat1, que contiene una fusión transcripcional *hilD-cat*, se transformó en la cepa silvestre de *S. Typhimurium*, así como en las cepas mutantes $\Delta hilD::km$ y *sirA::tet*. Posteriormente, se determinó la actividad específica de CAT a partir de muestras de cultivos de las transformantes crecidas en LB durante 5 horas.

La expresión de la fusión *hilD-cat* disminuyó 60% en la mutante *sirA::tet* y 95% en la mutante $\Delta hilD::km$, con respecto a su expresión en la cepa silvestre (Fig. 15). Estos resultados son consistentes con reportes previos que indican que HilD se autoregula positivamente (Olekhovich y Kadner, 2004) y que en una mutante *sirA* se disminuye alrededor del 50% la expresión de *hilD* (Ellermeier *et al.*, 2005).

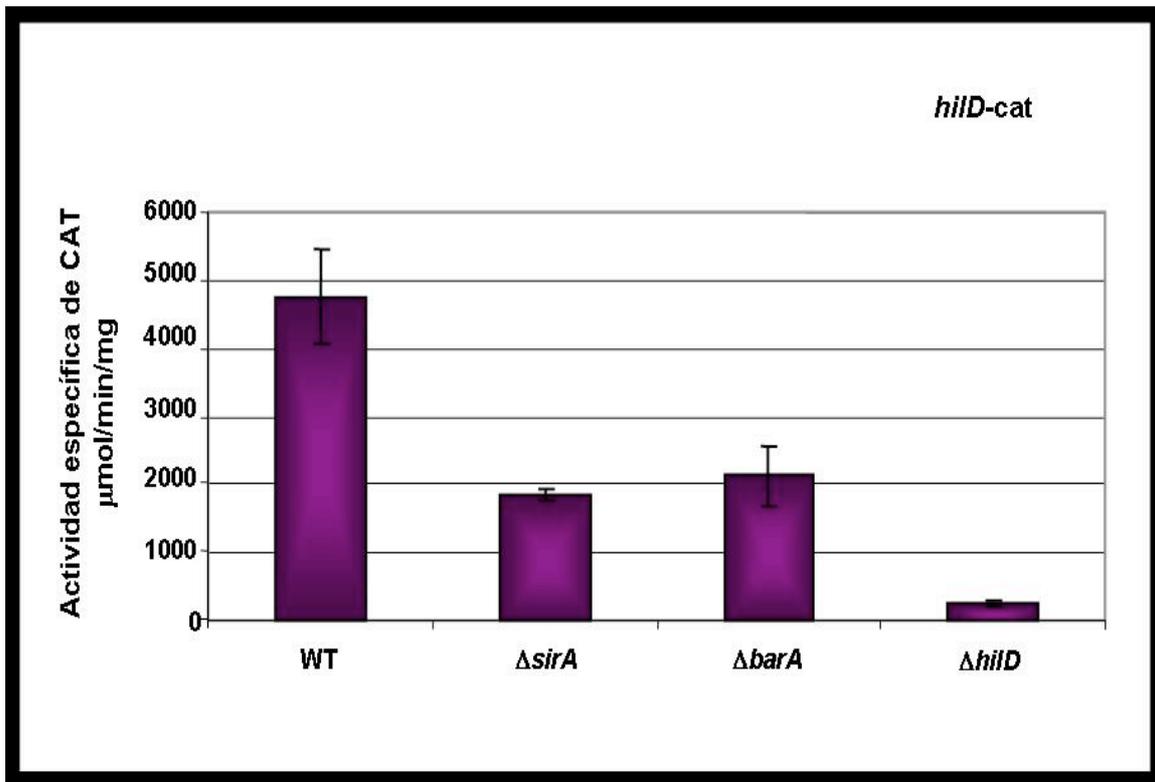


Fig. 15. SirA se requiere para la expresión óptima de HilD. El plásmido p*HilD-cat1* que contiene la fusión *hilD-cat*, fue transformado en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* SL1344, así como en sus derivadas mutantes *sirA::tet*, *ΔbarA::km* y *ΔhilD::km*. Las cepas transformadas se cultivaron en medio LB (Luria-Bertani) en agitación, a 37°C. La actividad específica de la enzima CAT (cloranfenicol acetil transferasa), expresada por la fusión, fue determinada de muestras de cultivos que se tomaron a las 5 horas de crecimiento. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que SirA se requiere solamente para la expresión óptima de *hilD*, actuando probablemente como un modulador positivo.

Para verificar los resultados anteriores, decidimos analizar la expresión de la proteína HilD en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en su derivada mutante $\Delta sirA$. Para esto, se etiquetó el gen cromosomal *hilD* con una secuencia que codifica el epítipo FLAG, en la cepa silvestre de *S. Typhimurium*, como se describe en la sección de metodología. Se obtuvieron extractos totales de proteínas a partir de muestras de cultivos de esta cepa, crecidos en LB durante 5 horas, los cuales se analizaron por “Western blot” utilizando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Como se muestra en la figura 16, no fuimos capaces de detectar la expresión de HilD-FLAG. En contraste, en este mismo experimento sí se detectaron las proteínas HilC-FLAG y SirA-FLAG (Fig. 16), a partir de cepas en las que se etiquetaron los genes *hilC* y *sirA*, las cuales fueron usadas como controles.

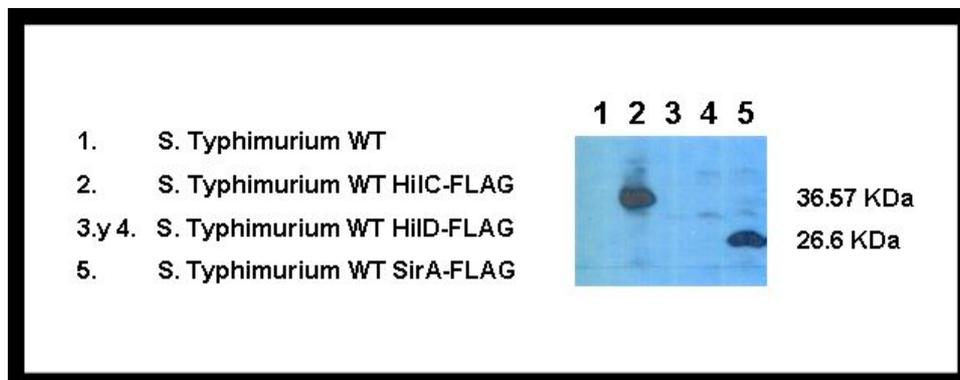


Fig. 16. La proteína HilD-FLAG no puede ser detectada inmunológicamente. La expresión de HilD-FLAG, HilC-FLAG y SirA-FLAG en cepas silvestres de *S. Typhimurium* SL1344, se analizó mediante “western immunoblot” utilizando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo FLAG. Para esto se utilizaron los extractos de proteínas totales de muestras de cultivos bacterianos crecidos en medio LB (Luria-Bertani) durante 5 horas.

Además, la cepa que contiene *hilD* etiquetado, está afectada en la secreción de proteínas, ya que no se detectaron las proteínas SipA, SipB y SipC, presentando un fenotipo similar al de la mutante $\Delta hilD$ (Fig. 17).

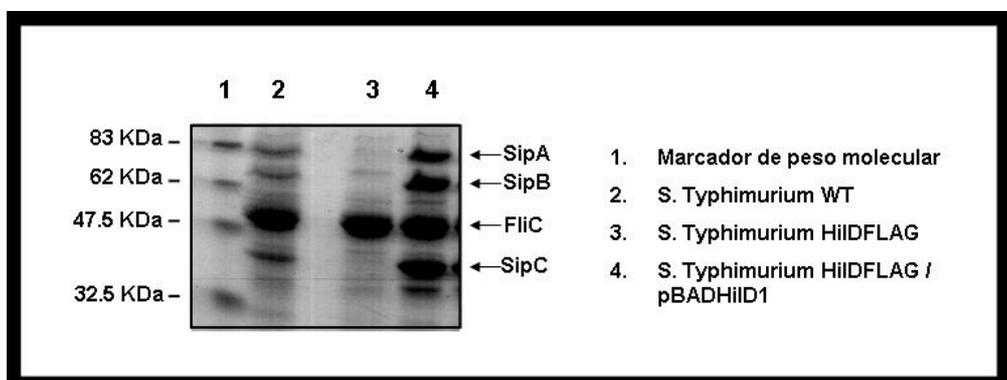


Fig. 17. El perfil de secreción proteica afectado en la cepa que contiene la proteína HilD-FLAG se restaura en presencia del plásmido que expresa HilD. Se analizó el perfil de secreción proteica de la cepa silvestre de *S. Typhimurium* SL1344, así como de las cepas que tienen la proteína HilD marcada con la etiqueta de FLAG en ausencia o presencia del plásmido pBADHilD. Este plásmido expresa a HilD bajo un promotor inducible con arabinosa. Se emplearon extractos de las proteínas secretadas a partir de muestras tomadas a las 10 horas de crecimiento en cultivos en medio LB (Luria-Bertani) a 37°C.

Para solucionar esto, procedimos a etiquetar el gen *hilD* con una secuencia que codifica para un epítipo de hemaglutinina (HA), que es tres veces más pequeño que el epítipo FLAG. Sin embargo, la proteína HilD-HA tampoco pudo ser detectada y la cepa que la expresa está también afectada en la secreción de proteínas (datos no mostrados).

Para tratar de discernir si las etiquetas afectan la actividad o la estabilidad de HilD, la cepa que tiene *hilD* etiquetado con FLAG se transformó con el plásmido

pBADHilD1, que expresa a HilD bajo un promotor inducible por arabinosa. Así, si la proteína HilD-FLAG fuera estable pero no funcional, la presencia de la proteína HilD tendría que inducir su expresión y de esta manera debería ser detectada en el experimento de western blot con el anticuerpo anti-FLAG. Como se esperaba, la presencia del plásmido pBADHilD1 restauró el perfil de secreción en la cepa que tiene *hilD* etiquetado con FLAG (Fig. 17). Sin embargo, aún en esta cepa no se detectó la proteína HilD-FLAG en el experimento de “Western blot” utilizando el anticuerpo anti-FLAG (Fig. 18). Estos resultados nos indicaron que la proteína HilD o el ARNm de *hilD* podrían ser inestables cuando se fusionan con las secuencias que codifican para los epítopos FLAG o HA.

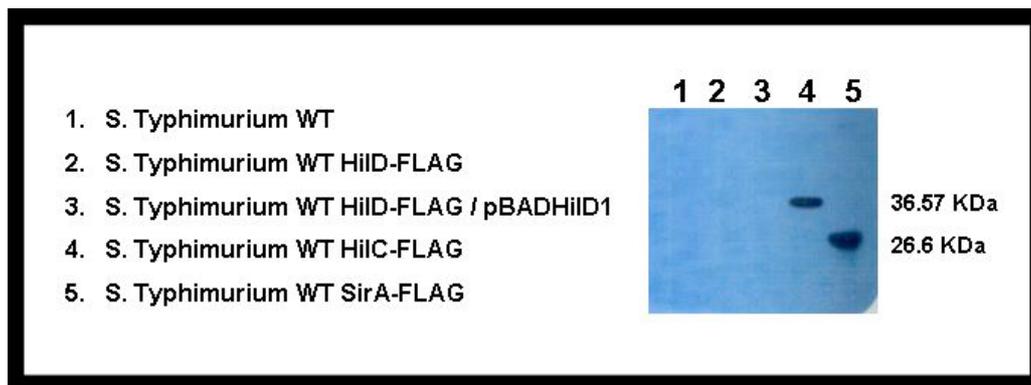


Fig. 18. La proteína HilD-FLAG no puede ser detectada inmunológicamente en presencia del plásmido que expresa HilD. La expresión de HilD-FLAG, fue analizada en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* SL1344 en presencia y ausencia del plásmido que expresa HilD. Asimismo, se analizó la expresión de HilC-FLAG y SirA-FLAG. La detección de las proteínas se analizó mediante “western immunoblot” utilizando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo FLAG. Se utilizaron extractos de proteínas totales a partir de muestras de cultivos bacterianos crecidos en medio LB (Luria-Bertani) durante 5 horas.

- **SirA requiere de su proteína cinasa BarA para regular la expresión de los genes de SPI-1.**

SirA forma un sistema de dos componentes junto con BarA, una proteína cinasa que fosforila a SirA y que se propone es la encargada de la detección de señales ambientales que regulan la expresión de los genes de SPI-1 (Lawhon *et al.*, 2002; Altier *et al.*, 2000). Con el fin de determinar si SirA requiere de su cinasa BarA para su papel de regulador positivo de la expresión de los genes de SPI-1, se evaluó la expresión de las fusiones *hilA-cat*, *hilC-cat* y *hilD-cat* en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en sus derivadas mutantes $\Delta barA::km$ y $\Delta sirA::km$.

Como se muestra en las figuras 15, 19 y 20, hubo una disminución similar de la expresión de las fusiones *hilA-cat*, *hilC-cat* y *hilD-cat* en las mutantes $\Delta sirA::km$ y $\Delta barA::km$, con respecto a su expresión en la cepa silvestre.

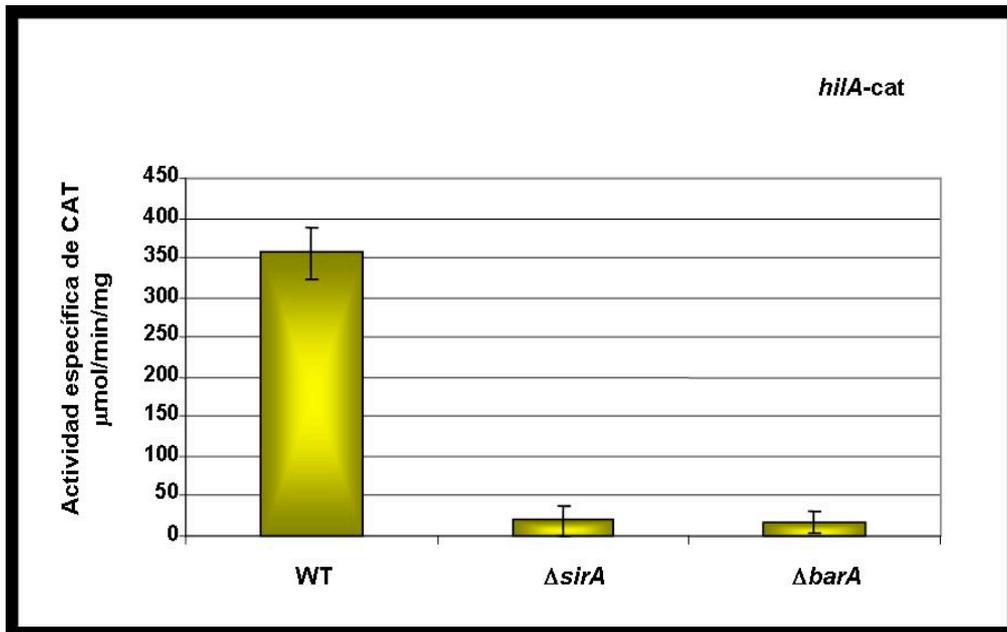


Fig. 19. SirA necesita de BarA para inducir la expresión de *hilA*. El plásmido pHilA-cat1 que expresa la fusión *hilA-cat* fue transformado en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* SL1344 y en sus derivadas mutantes $\Delta sirA::km$ y $\Delta barA::km$. La actividad específica de la enzima CAT (cloranfenicol acetil transferasa), expresada por la fusión, fue determinada de muestras de cultivos que se tomaron a las 5 horas de crecimiento en medio LB (Luria-Bertani) en agitación, a 37°C. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

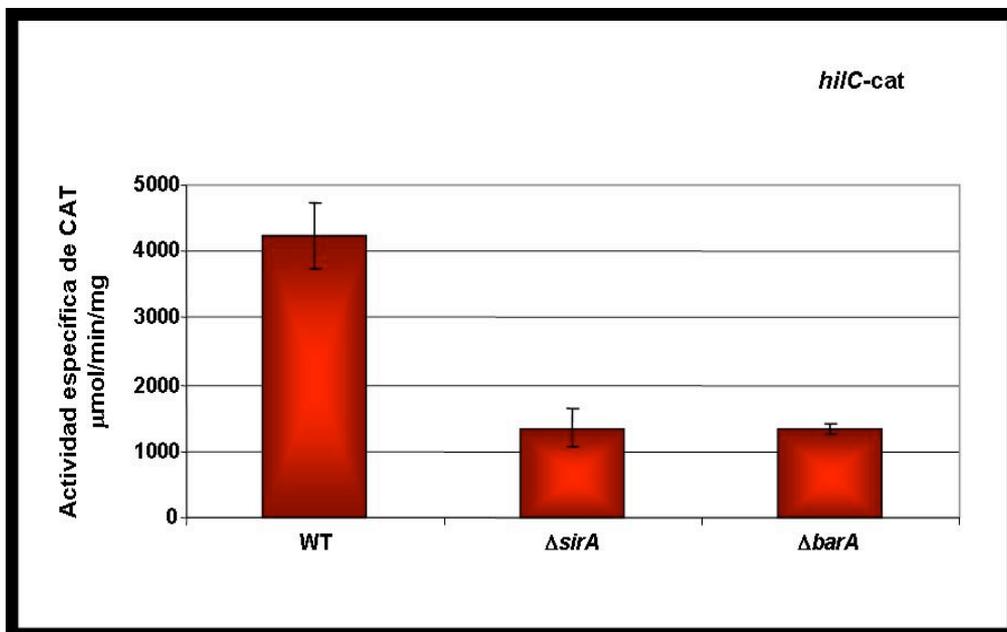


Fig. 20. SirA necesita de BarA para inducir la expresión de *hilC*. El plásmido pHilC-cat1 que expresa la fusión *hilC-cat* fue transformado en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* SL1344 y en sus derivadas mutantes $\Delta sirA::km$ y $\Delta barA::km$. Las cepas transformadas se cultivaron en medio LB (Luria-Bertani) en agitación, a 37°C. La actividad específica de la enzima CAT (cloranfenicol acetil transferasa), expresada por la fusión, fue determinada de muestras de cultivos que se tomaron a las 5 horas de crecimiento. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que SirA necesita de BarA para ejercer su papel como regulador positivo de la expresión de los genes de SPI-1.

- **SirA regula positivamente la expresión de *hilC* y *rtsA*, a través de la regulación de *hilD*.**

Como mostramos en los experimentos anteriores, SirA regula positivamente la expresión de *hilD* y *hilC*. Estudios previos han reportado que SirA induce la expresión de *hilC* al unirse directamente a su región reguladora (Teplitski et al., 2003). Además, se ha reportado que la sobre-expresión de HilD, HilC y RtsA incrementa la expresión de sus propios genes y, recíprocamente, la de los otros dos genes que codifican estas proteínas homólogas (Olekhovich y Kadner, 2004; Ellermeier et al., 2005). Con base en estos resultados se ha propuesto que HilD, HilC y RtsA forman entre ellas un circuito de regulación positivo (Ellermeier et al., 2005).

Para definir de qué manera SirA regularía la expresión del circuito de regulación formado por HilD, HilC y RtsA, analizamos la expresión de las fusiones transcripcionales *hilD-cat*, *hilC-cat* y *rtsA-cat* en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en sus derivadas mutantes $\Delta sirA::km$, $\Delta hilD::km$, $\Delta hilC::km$ y $\Delta rtsA::km$.

Los niveles de expresión de las fusiones *hilD-cat*, *hilC-cat* y *rtsA-cat* disminuyeron en las mutantes $\Delta sirA::km$ y $\Delta hilD::km$, siendo más drástica dicha disminución en la mutante $\Delta hilD::km$ (Figs. 21, 22 y 23). En contraste, en las mutantes $\Delta hilC::km$ y $\Delta rtsA::km$, la expresión de *hilC*, *hilD* y *rtsA* fue similar a los niveles que se obtienen en una cepa silvestre (Figs. 21, 22 y 23). Estos resultados indican que, en las condiciones de crecimiento evaluadas, SirA y HilD regulan positivamente la expresión de *hilD*, *hilC* y *rtsA*, mientras que HilC y RtsA no tienen un papel en la expresión de estos genes.

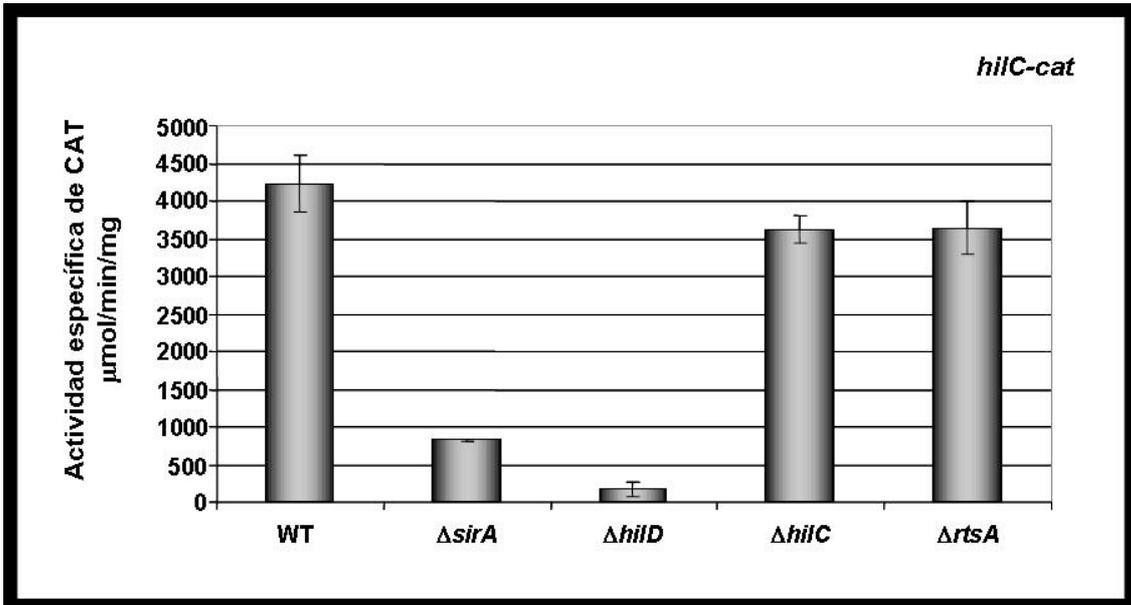


Fig. 21. SirA y HilD están involucrados en la expresión de *hilC*. La cepa silvestre de *S. Typhimurium* SL1344, así como sus derivadas mutantes $\Delta sirA::km$, $\Delta hilD::km$, $\Delta hilC::km$ y $\Delta rtsA::km$, fueron transformadas con el plásmido pHilC-cat1 que expresa la fusión *hilC-cat*. Las cepas transformadas se cultivaron en medio LB (Luria-Bertani) en agitación, a 37°C. La actividad específica de la enzima CAT (cloranfenicol acetil transferasa), expresada por la fusión, fue determinada de muestras de cultivos que se tomaron a las 5 horas de crecimiento. Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos realizados de manera independiente.

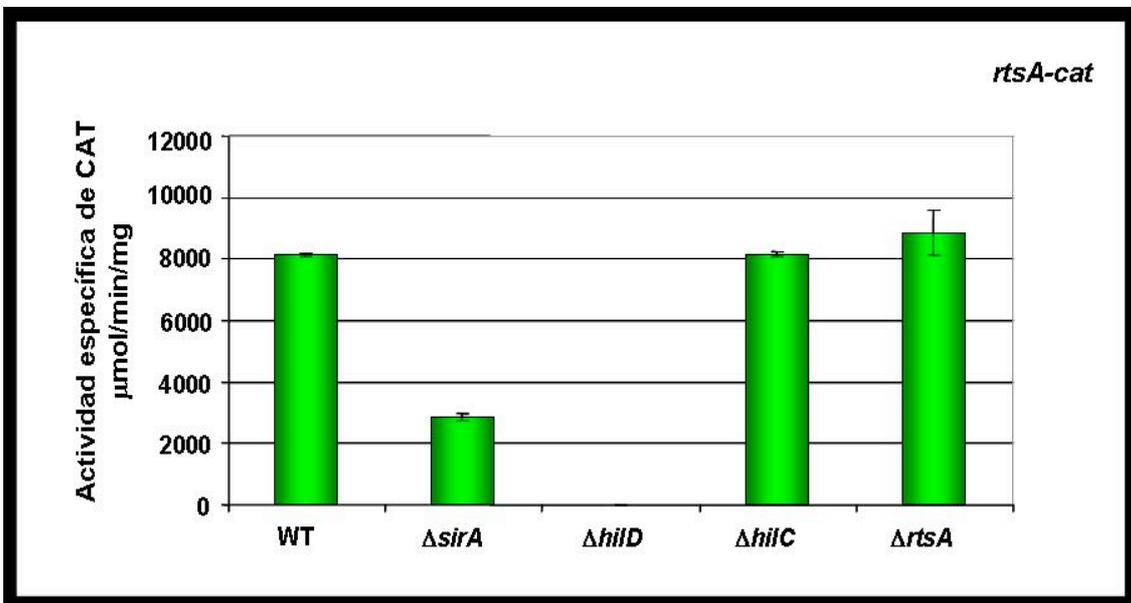


Fig. 22. SirA y HilD controlan la expresión de *rtsA*. El plásmido pRtsA-cat1 que expresa la fusión *rtsA-cat*, fue transformado en la cepa de *S. Typhimurium* SL1344, así como en sus derivadas mutantes $\Delta sirA::km$, $\Delta hilD::km$, $\Delta hilC::km$ y $\Delta rtsA::km$. La expresión de la fusión fue determinada mediante la cuantificación de la actividad específica de CAT (cloranfenicol acetil transferasa) a partir de muestras de cultivos crecidos en medio LB (Luria-Bertani) en agitación, a 37°C durante 5 horas. Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes.

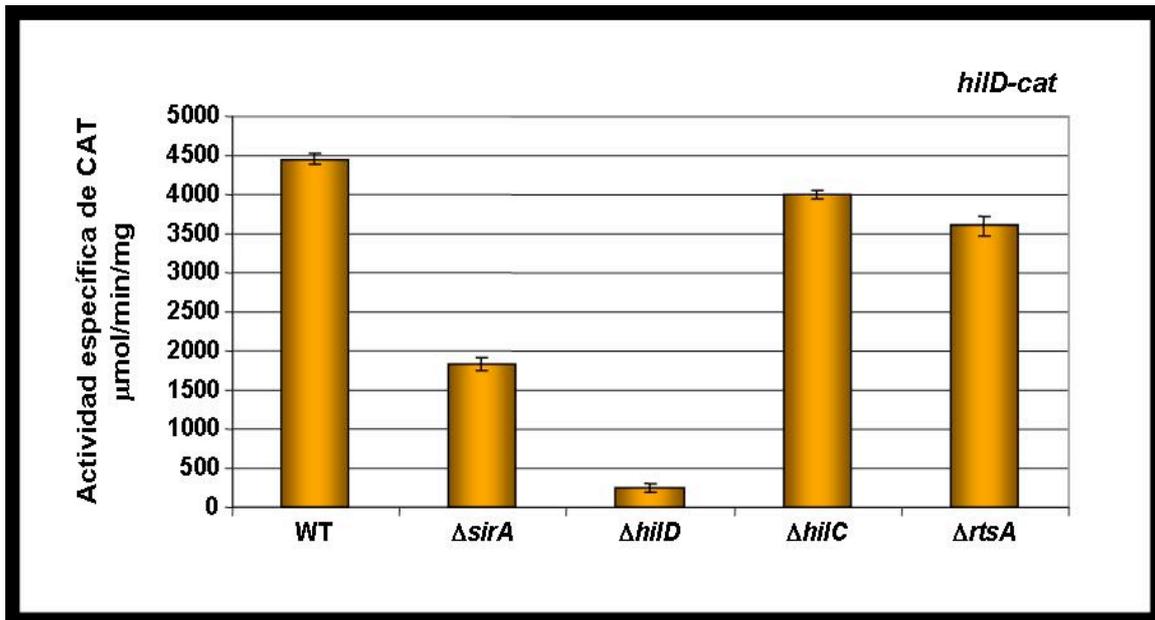


Fig. 23. SirA y HilD están involucrados en la expresión de *hilD*. La expresión de la fusión *hilD-cat*, a partir del plásmido pHilD-cat1, fue analizada en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* SL1344 y en sus derivadas mutantes $\Delta sirA::km$, $\Delta hilD::km$, $\Delta hilC::km$ y $\Delta rtsA::km$. Las cepas analizadas se cultivaron en medio LB (Luria-Bertani) en agitación, a 37°C. La expresión de la fusión fue analizada mediante la cuantificación de la actividad específica de la enzima CAT (cloranfenicol acetil transferasa), a partir de muestras de cultivos que se tomaron a las 5 horas de crecimiento. Los datos son representativos de tres experimentos realizados de manera independiente.

Para determinar si el efecto de SirA sobre la expresión de los genes *hilC* y *rtsA* es directo, o es a través de HilD, se analizó la expresión de las fusiones *hilD-cat*, *hilC-cat* y *rtsA-cat* en cepas de *E. coli* que contienen plásmidos que expresan HilD o SirA, pT3HilD1 o pT3SirA1, respectivamente.

La presencia del plásmido pT3HilD1 indujo la expresión de las fusiones *hilC-cat* y *rtsA-cat* en *E. coli*, las cuales son inactivas en presencia del plásmido pT3SirA1 o el vector pMPM-T3 (Figs. 24 y 25). En contraste, la fusión de *hilD-cat* es activa en *E. coli* en presencia únicamente del vector; sin embargo, en presencia del plásmido pT3HilD1 su actividad se incrementó, lo cual es consistente con la autoregulación. Por su parte, el plásmido pT3SirA1 no tuvo efecto en la actividad de la fusión *hilD-cat* (Fig. 26).

En conjunto, estos resultados indican que SirA regula la expresión de *hilC* y *rtsA* a través de HilD. Así mismo, muestran que HilD no requiere de otro regulador de *Salmonella* para inducir la expresión de *hilC* y *rtsA*. Además, revelan que, en *E. coli*, *hilD* se expresa en ausencia de HilD y SirA.

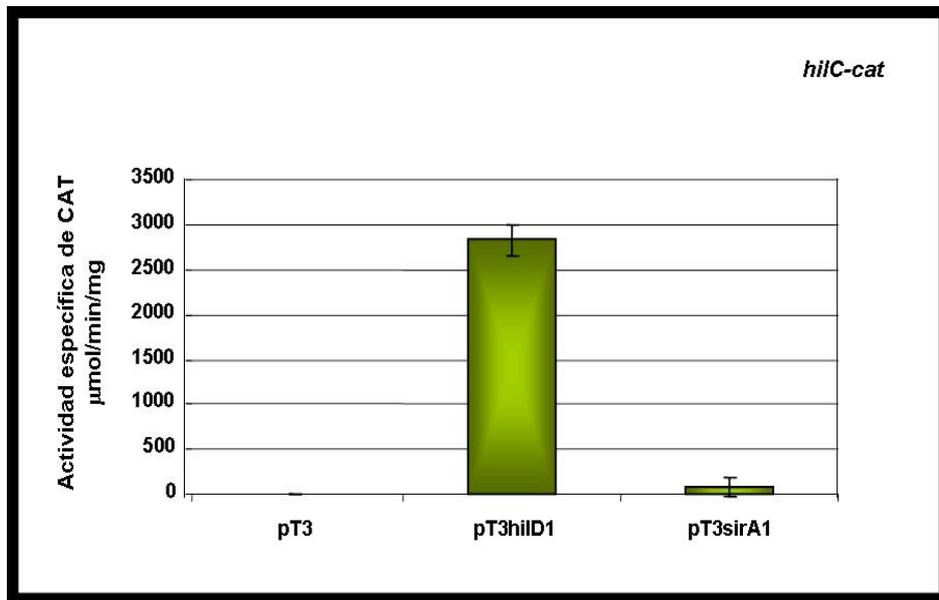


Fig. 24. HilD induce directamente la expresión de la fusión *hilC-cat* en *E. coli*. Se analizó la expresión de la fusión *hilC-cat* contenida en el plásmido p*HilC-cat*1, en la cepa silvestre de *E. coli* MC4100, en presencia de los plásmidos que expresan a HilD (pT3HilD1) o SirA (pT3SirA1) bajo un promotor constitutivo. Se emplearon muestras de cultivos a las 5 horas de crecimiento en LB (Luria-Bertani) a 37°C. Los resultados mostrados representan el promedio de tres experimentos realizados de manera independiente.

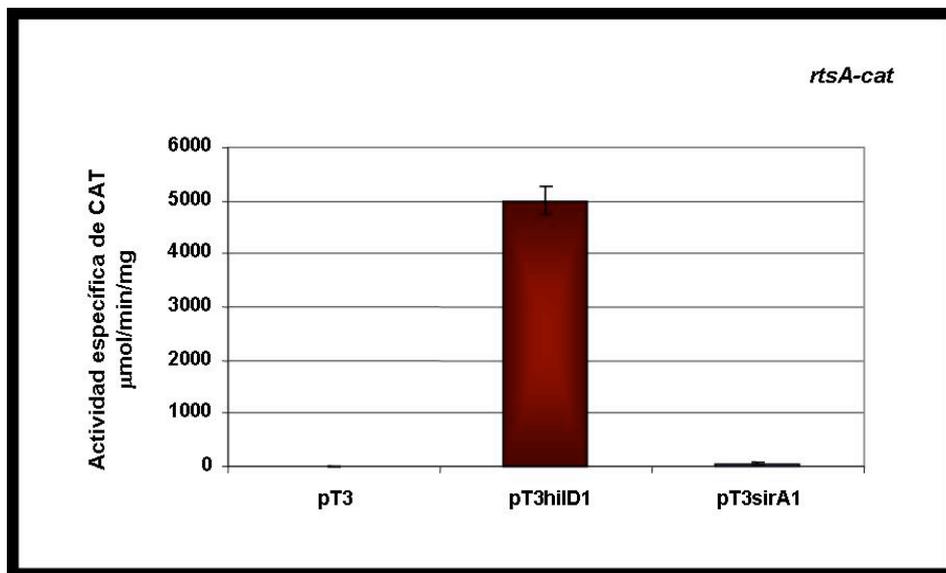


Fig. 25. HilD puede inducir directamente la expresión de *rtsA* en *E. coli*. El plásmido p*RtsA-cat*1 que expresa la fusión *rtsA-cat*, fue transformado en la cepa silvestre de *E. coli* MC4100 en presencia de los plásmidos pT3HilD1 y pT3SirA1 que expresan a HilD y SirA respectivamente, bajo el promotor de *lac*. La expresión de la fusión *rtsA-cat* se determinó de muestras de cultivos a las 5 horas de crecimiento en LB (Luria-Bertani) a 37°C. Los resultados obtenidos representan el promedio de tres experimentos independientes.

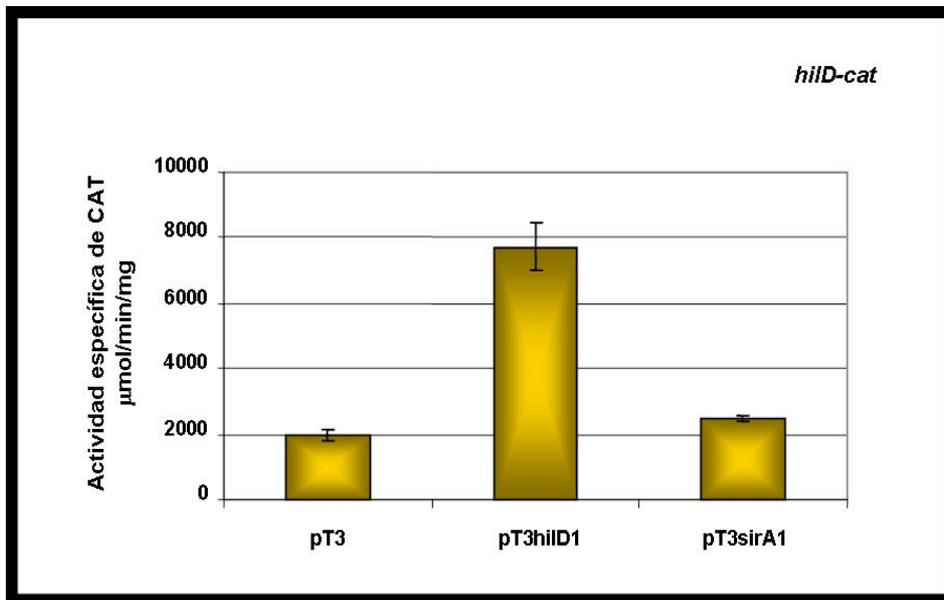


Fig. 26. HilD es capaz de inducir su propia expresión en *E. coli*. La expresión de la fusión *hilD-cat* contenida en el plásmido pHilD-cat1 fue analizada en la cepa silvestre de *E. coli* MC4100 que contiene el plásmido que expresa a HilD (pT3HilD1) o SirA (pT3SirA1). La actividad específica de CAT (cloranfenicol acetil transferasa), expresada por la fusión, se determinó de muestras de cultivos a las 5 horas de crecimiento en LB (Luria-Bertani) a 37°C. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos realizados de manera independiente.

- **La cascada de regulación formada por SirA y HilD se requiere para la expresión de los genes de SPI-2 .**

En estudios anteriores se había reportado que los genes de SPI-1 y SPI-2 se expresan sólo cuando se crece a *Salmonella* en medio LB o medio mínimo, respectivamente. Así, se ha postulado que el crecimiento en medio LB semeja las condiciones extracelulares en el intestino, mientras que el crecimiento en medio mínimo mimetiza las condiciones intracelulares que encuentra *Salmonella* en sus hospederos.

Sin embargo, en nuestro grupo de investigación se encontró que, al igual que los genes de SPI-1, los genes de SPI-2 se expresan cuando se crece a *Salmonella* en el medio de cultivo LB. Pero mientras que los genes de SPI-1 se expresan al final de la fase exponencial de crecimiento, los genes de SPI-2 se expresan en una etapa muy tardía de la fase estacionaria (Fig. 6). Además, se ha determinado que HilD y SirA, reguladores de los genes de SPI-1, se requieren para la expresión de los genes de SPI-2 en estas condiciones de crecimiento (Fig. 7).

Para determinar si SirA y HilD regulan la expresión de los genes de SPI-2 a través de la regulación del sistema de dos componentes SsrA/B, codificado en SPI-2, el cual controla la expresión de todos los genes de SPI-2, se analizó la expresión de SsrB en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en sus mutantes derivadas $\Delta hilA::km$, $\Delta hilD::km$, $\Delta hilC::km$, $\Delta sirA::km$, $\Delta ompR::km$ y $\Delta ssrB::km$. Para esto, se obtuvieron

extractos totales de proteínas de muestras de cultivos de estas cepas crecidos en LB durante 10 horas, los cuales se analizaron por western blot, utilizando un anticuerpo policlonal anti-SsrB.

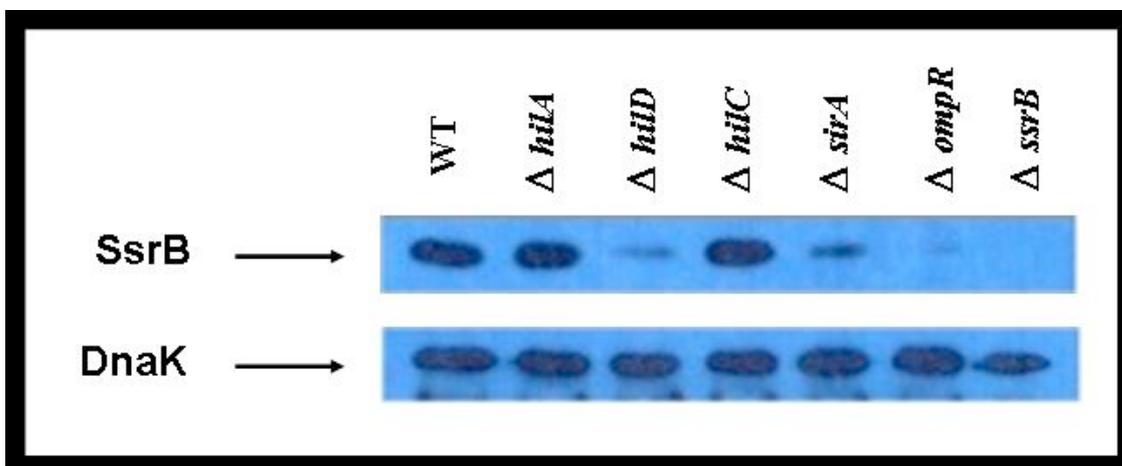


Fig. 27. SirA, HilD y OmpR son requeridos para la expresión de SsrB en medio LB. La expresión de SsrB en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* SL1344, así como en sus derivadas mutantes $\Delta hila::km$, $\Delta hilD::km$, $\Delta hilC::km$, $\Delta sirA::km$, $\Delta ompR::km$, y $\Delta ssrB::km$, fue analizada mediante “western immunoblot” utilizando un anticuerpo policlonal contra SsrB. Se utilizaron extractos totales obtenidos a partir de muestras de cultivos bacterianos crecidos en medio LB (Luria-Bertani) durante 10 horas. Como control se detectó la expresión de DnaK, una proteína de expresión constitutiva.

La Fig. 27 muestra que la expresión de SsrB se reduce drásticamente en las mutantes $\Delta hilD::km$, $\Delta sirA::km$ y $\Delta ompR::km$. En contraste, SsrB se detectó en las mutantes $\Delta hila::km$ y $\Delta hilC::km$ de la misma manera que en la cepa silvestre (Fig. 27). Como un control, en los mismos extractos de proteínas se detectó la presencia de DnaK, una proteína que se expresa constitutivamente. Como se esperaba, DnaK se detectó de manera similar en todas las cepas analizadas (Fig. 27).

Estos resultados indicaron que SirA, HilD y OmpR son requeridos para la expresión de SsrB en medio LB, una condición que semeja el ambiente extracelular que detecta *Salmonella* en el intestino.

Para definir si la regulación positiva de *ssrB* mediada por SirA y HilD se da en cascada, al igual que la regulación de *hila*, la expresión de SsrB se analizó en las cepas mutantes $\Delta hilD::km$ y $\Delta sirA::km$ que contienen los plásmidos pBADHilD1 o pBADSirA1, que expresan HilD o SirA, respectivamente. La expresión de SsrB se detectó por western blot como se describió en el experimento anterior.

La expresión de HilD a partir del plásmido pBADHilD1 restauró la expresión de SsrB en las mutantes $\Delta hilD::km$ y $\Delta sirA::km$, mientras que la expresión de SirA a partir del plásmido pBADSirA1 restauró la expresión de SsrB únicamente en la cepa $\Delta sirA::km$ (Fig. 28).

Estos resultados indicaron que la cascada de regulación formada por SirA y HilD controla positivamente la expresión de *ssrB*, de manera similar a como lo hace para la expresión de *hila*.

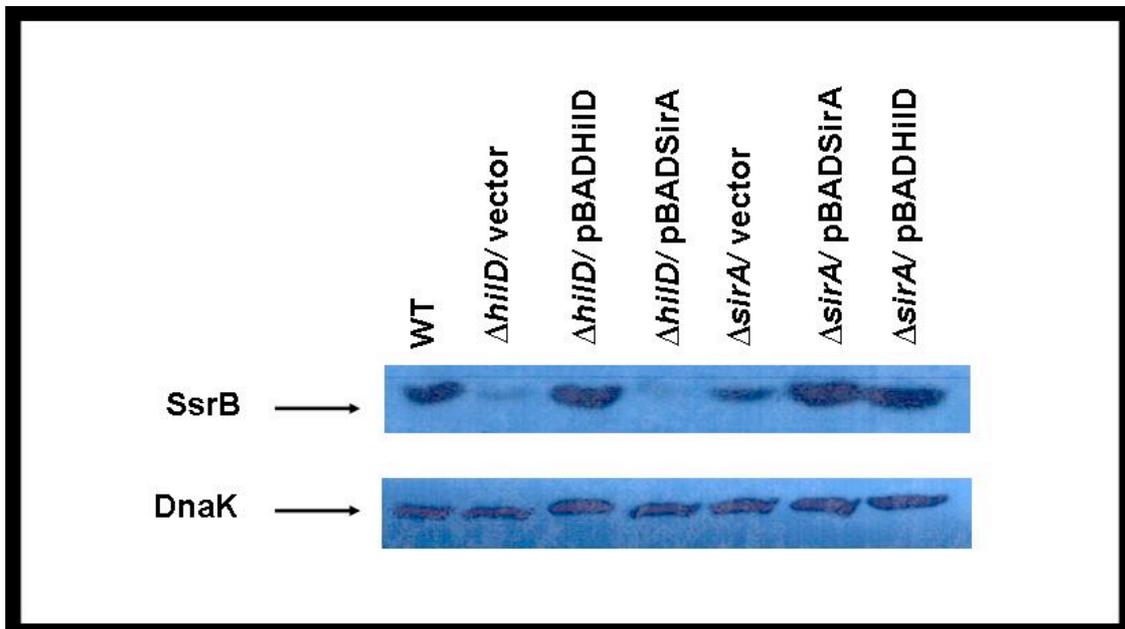


Fig. 28. La cascada de regulación conformada por SirA y HilD, controla la expresión de SsrB. La expresión de SsrB fue detectada en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* SL1344 y en las cepas mutantes $\Delta hilD::km$ y $\Delta sirA::km$ que contienen los plásmidos que expresan a HilD (pBADHiID1) o a SirA (pBADSirA1) bajo un promotor inducible con arabinosa. La detección se realizó mediante “western immunoblot” utilizando un anticuerpo policlonal contra SsrB. Se utilizaron extractos de proteínas totales obtenidos a partir de muestras de cultivos bacterianos crecidos en medio LB (Luria-Bertani) durante 10 horas. Como control se detectó la expresión de DnaK, una proteína de expresión constitutiva.

- **SirA no se requiere para la enfermedad sistémica producida por *S. Typhimurium* en el ratón.**

Previamente se ha reportado que cepas de *S. Typhimurium* con mutaciones en genes de SPI-1 están atenuadas cuando son inoculadas por vía oral (VO) en el ratón, pero no por vía intraperitoneal (VIP) (Galán y Curtís, 1989), mientras que las mutantes en genes de SPI-2 están atenuadas cuando se inoculan tanto por VO como por VIP (Hensel *et al.*, 1998).

Dada la importancia de SirA para activar la expresión tanto de genes de la SPI-1 como de la SPI-2, se analizó la sobrevivencia en ratón de la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y de su derivada mutante $\Delta sirA::km$, inoculadas VO y VIP, con el fin de determinar la importancia que tiene la función de SirA en la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, observada *in vitro*, durante la infección de *S. Typhimurium* al ratón. Para esto, se determinó lo que se conoce como el índice de competencia (IC), en el cual se compara la sobrevivencia en un mismo ratón de una cepa silvestre y una mutante. El IC se obtiene al infectar a un ratón con una mezcla de igual número de bacterias de las dos cepas y posteriormente cuantificar el número de bacterias de cada cepa que se recuperan de los órganos, principalmente el hígado y el bazo. La relación del número de bacterias inoculadas y recuperadas de los órganos de la cepa silvestre y mutante es el IC. Un IC de 1 significa que ambas cepas de la mezcla sobreviven y son recuperadas en

igual cantidad en los órganos, es decir, que ambas cepas pudieron llegar a colonizar los órganos de la misma manera, mostrando el mismo grado de virulencia.

Para la inoculación VO se obtuvieron los IC de la mezcla $\Delta sirA::km/silvestre$ de dos ratones, mientras que para la inoculación VIP se obtuvieron los IC de cuatro ratones; en ambos casos, con las bacterias recuperadas del hígado o del bazo. Como un control de estos experimentos también se obtuvieron los IC para la mezcla $\Delta ssrB::km/silvestre$. Como se mencionó anteriormente, el gen *ssrB* codifica para el principal regulador de los genes de SPI-2. Los IC que se obtuvieron con las bacterias recuperadas a partir del hígado o el bazo fueron similares (Figs. 29 y 30; Tablas 6 y 7), así que se obtuvieron promedios que incluyen los IC de estos dos órganos.

Para la mezcla de bacterias $\Delta sirA::km/silvestre$ inoculada VO o VIP el IC promedio fue de 1.46 y 0.391, respectivamente. En contraste, para la mezcla de bacterias $\Delta ssrB::km/silvestre$ inoculada VO o VIP el IC promedio fue de 2.36×10^{-6} y 2.8×10^{-4} , respectivamente (Figs. 29 y 30; Tablas 6 y 7). Estos resultados muestran claramente que la mutante $\Delta sirA::km$ sobrevive y coloniza el hígado y el bazo de manera similar a la cepa silvestre, mientras que la mutante $\Delta ssrB::km$ está severamente atenuada en su capacidad de sobrevivir y colonizar estos órganos.

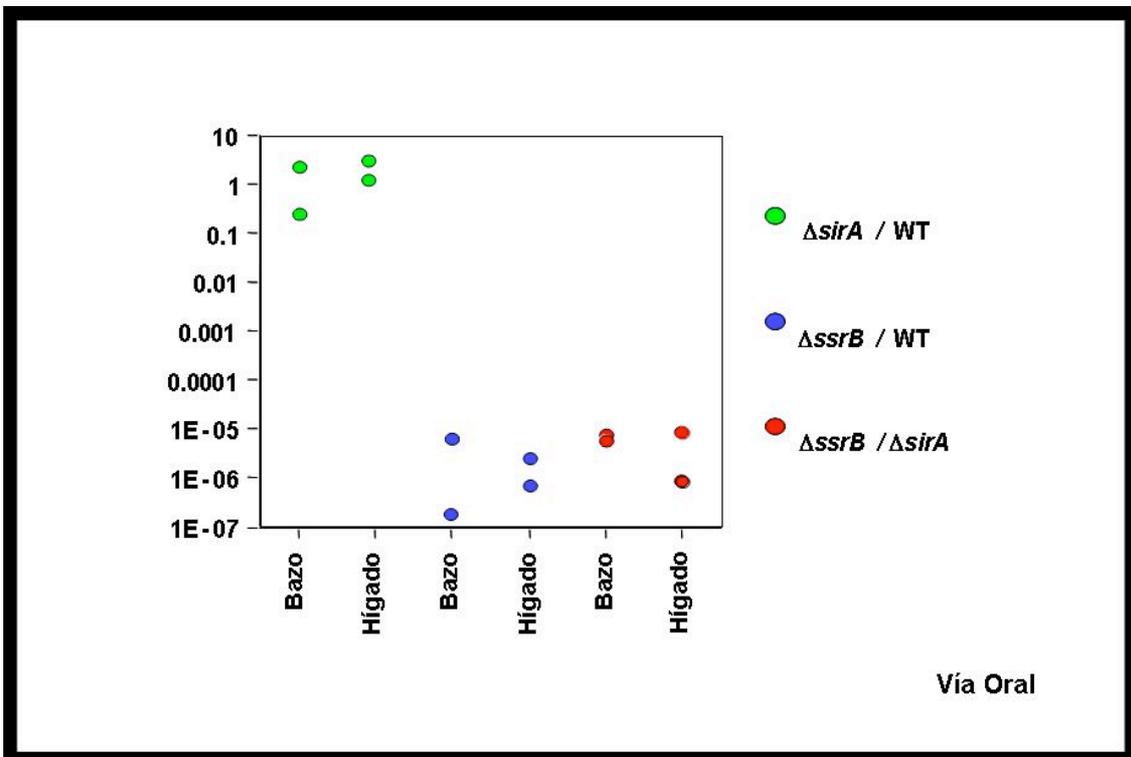


Fig. 29. La mutante en *sirA* no está atenuada cuando se inocula por vía oral a ratones. La sobrevivencia en ratones de la cepa mutante en *sirA* se determinó mediante el cálculo de los Índices de competencia (IC) de las cepas de *S. Typhimurium* $\Delta sirA::km/silvestre$, $\Delta ssrB::km/silvestre$ y $sirA::tet/\Delta ssrB::km$. Se analizó el bazo e hígado de ratones infectados por vía oral. Cada punto equivale a un ratón infectado.

Tabla 6. Índices de competitividad obtenidos con la inoculación de las cepas $\Delta sirA::km/silvestre$, $\Delta ssrB::km/silvestre$ y $\Delta ssrB::km/sirA::tet$ por vía oral. Cada par de órganos (hígado y bazo), corresponde a un ratón

| Mezcla $\Delta sirA/silvestre$ | | Mezcla $\Delta ssrB/silvestre$ | | Mezcla $\Delta ssrB/sirA$ | |
|--------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| Órganos | IC | Órganos | IC | Órganos | IC |
| Bazo 1 | 2.19 | Bazo 1 | 1.6 x 10 ⁻⁷ | Bazo 1 | 5.36 x 10 ⁻⁶ |
| Bazo 2 | 0.25 | Bazo 2 | 6.22 x 10 ⁻⁶ | Bazo 2 | 6.92 x 10 ⁻⁶ |
| Hígado 1 | 2.41 | Hígado 1 | 6.6 x 10 ⁻⁷ | Hígado 1 | 8.2 x 10 ⁻⁷ |
| Hígado 2 | 1.01 | Hígado 2 | 2.38 x 10 ⁻⁶ | Hígado 2 | 7.9 x 10 ⁻⁶ |
| PROMEDIO | 1.46 | | 2.36 X 10⁻⁶ | | 5.25 X 10⁻⁶ |

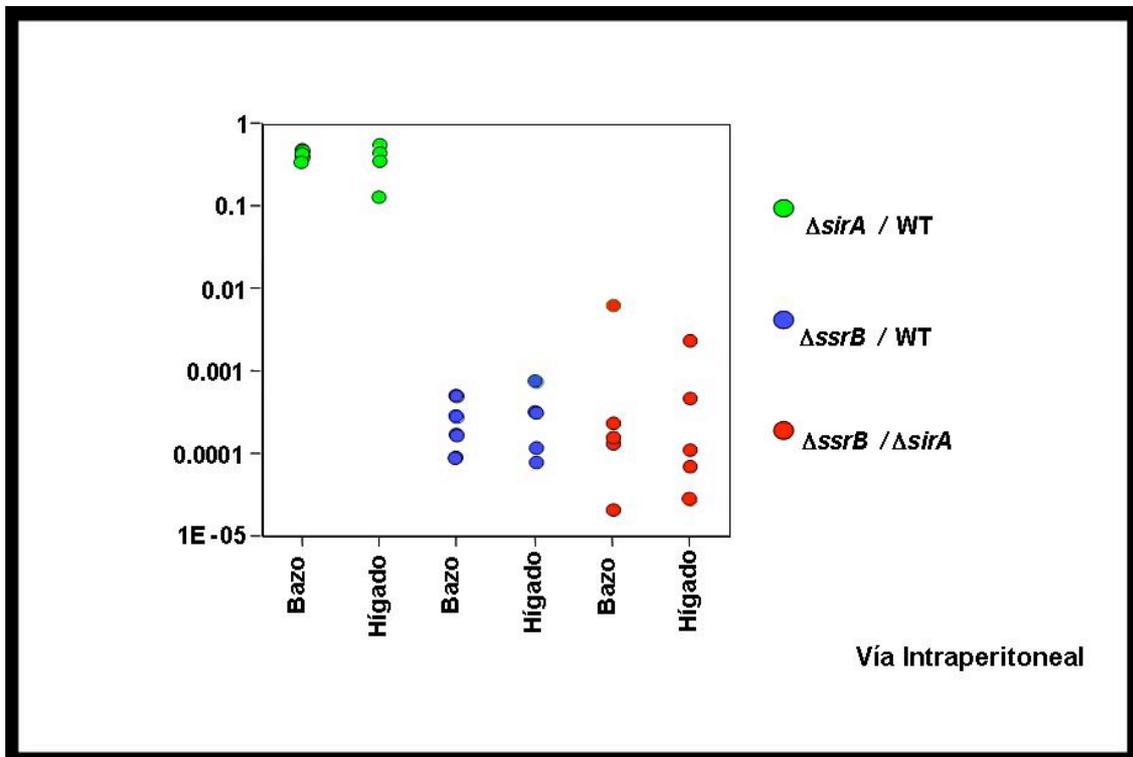


Fig. 30. La mutante en *sirA* está muy poco atenuada cuando se inocula por vía intraperitoneal a ratones. La sobrevivencia en ratones de la cepa mutante en *ΔsirA* se determinó mediante el cálculo de los Índices de competencia (IC) de las cepas de *S. Typhimurium* *ΔsirA::km/silvestre*, *ΔssrB::km/silvestre* y *ΔssrB::km/sirA::tet*. Se analizó el bazo e hígado de ratones infectados por vía intraperitoneal. Cada punto equivale a un ratón infectado.

Tabla 7. Índices de competitividad obtenidos con la inoculación de las cepas *ΔsirA::km/silvestre*, *ΔssrB::km/silvestre* y *sirA::Tet/ΔssrB::km* por vía intraperitoneal. Cada par de órganos (hígado y bazo), corresponde a un ratón

| Mezcla <i>ΔsirA/silvestre</i> | | Mezcla <i>ΔssrB/silvestre</i> | | Mezcla <i>ΔssrB/ΔsirA</i> | |
|-------------------------------|---------------|-------------------------------|--|---------------------------|---|
| Órganos | IC | Órganos | IC | Órganos | IC |
| Bazo 1 | No se trabajó | Bazo 1 | 4.84×10^{-4} | Bazo 1 | 1.5×10^{-4} |
| Bazo 2 | 0.42 | Bazo 2 | 1.63×10^{-4} | Bazo 2 | 2.1×10^{-5} |
| Bazo 3 | 0.47 | Bazo 3 | 8.45×10^{-5} | Bazo 3 | 6×10^{-3} |
| Bazo 4 | 0.39 | Bazo 4 | 2.69×10^{-4} | Bazo 4 | 1.3×10^{-4} |
| | | | | Bazo 5 | 2.3×10^{-4} |
| Hígado 1 | 0.12 | Hígado 1 | 7.64×10^{-5} | Hígado 1 | 4.7×10^{-4} |
| Hígado 2 | 0.34 | Hígado 2 | 3.10×10^{-4} | Hígado 2 | 2.8×10^{-5} |
| Hígado 3 | 0.44 | Hígado 3 | 7.35×10^{-4} | Hígado 3 | 2.3×10^{-3} |
| Hígado 4 | 0.56 | Hígado 4 | 1.17×10^{-4} | Hígado 4 | 1.1×10^{-4} |
| | | | | Hígado 5 | 7×10^{-5} |
| PROMEDIO | 0.391 | | 2.8×10^{-4} | | 9.45×10^{-4} |

Para descartar que un probable defecto en la virulencia de la mutante $\Delta sirA::km$ pudiera ser enmascarado al mezclarse con la cepa silvestre, se obtuvieron los IC para una mezcla $\Delta ssrB::km/sirA::tet$ inoculada por VIP y VO. Los IC promedio para esta mezcla inoculada VO o VIP fueron 5.25×10^{-6} y 9.45×10^{-4} , respectivamente (Figs. 29 y 30; Tablas 6 y 7). Estos IC son similares a los obtenidos con la mezcla $\Delta ssrB::km/silvestre$, mostrando que el efecto en atenuación de la mutante $\Delta ssrB::km$ es similar cuando se compara con la cepa silvestre y con la mutante $sirA::tet$, lo que indica que la cepa silvestre y las mutantes en $sirA$ sobreviven de manera similar en el ratón.

En conjunto, estos resultados indican que SirA no se requiere para la enfermedad sistémica que produce *S. Typhimurium* en el ratón.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El mecanismo por el cual SirA regula positivamente la expresión de HilA, el regulador central de los genes de SPI-1, no es claro. Por un lado, se ha propuesto que existe una regulación en cascada, en la que SirA induce la expresión de HilD y éste a su vez regula positivamente la expresión de HilA (Ellermeier *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha observado que en una mutante *sirA*, la expresión de una fusión transcripcional *hilD-lacZ* sólo se disminuye alrededor del 50%, con respecto a su expresión en una cepa silvestre de *Salmonella* (Ellermeier *et al.*, 2005). Además, se ha reportado que ambos reguladores, SirA y HilD, interactúan con la región reguladora de *hila*, pero que SirA no interactúa con la región reguladora de *hilD* (Akbar *et al.*, 2003; Schechter y Lee, 2001; Olekhovich y Kadner, 2002; Teplitski *et al.*, 2003).

Uno de los objetivos de este proyecto fue el esclarecer el mecanismo por el cual SirA y HilD regulan positivamente la expresión de HilA. Para esto inicialmente nos planteamos tres posibilidades. La primera, que SirA regulara positivamente a HilD y éste a su vez activara la expresión de HilA. La segunda, que HilD controlara positivamente la expresión de SirA y éste a su vez activara la expresión de HilA. Y la tercera, que se requiriera tanto de SirA como de HilD para que, en conjunto, indujeran la expresión de HilA (Fig. 8).

Nuestros primeros resultados confirmaron que HilD y SirA se requieren para la expresión de HilA, ya que la expresión de una fusión *hila-cat* disminuyó dramáticamente en las cepas mutantes *sirA::tet* y Δ *hilD::km* con respecto a su expresión en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* (Fig. 10). Posteriormente, mostramos que la presencia de plásmidos que expresan HilD o SirA, bajo un promotor constitutivo, restauran la expresión de la fusión *hila-cat* en la cepa Δ *sirA* (Fig. 11). En contraste, sólo el plásmido que expresa HilD restaura la expresión de esta fusión en la cepa Δ *hilD* (Fig. 11). Así, estos resultados indicaron que cuando se expresa a HilD bajo un promotor constitutivo, ya no se requiere de la presencia de SirA para que *hila* se exprese.

Resultados similares se obtuvieron al analizar los perfiles de las proteínas secretadas en estas cepas, ya que plásmidos que expresan HilD o SirA, restauran el perfil de proteínas secretadas en una cepa mutante Δ *sirA*, mientras que únicamente el plásmido que expresa HilD restaura el perfil de secreción en una mutante Δ *hilD* (Fig. 13). En estos perfiles se detectan varias proteínas efectoras codificadas en SPI-1, cuya secreción depende del SSTT, también codificado en SPI-1. HilA regula positivamente la expresión de los genes que codifican tanto para las proteínas efectoras como para las proteínas que forman el SSTT. Así, el análisis de los perfiles de proteínas secretadas permitió evaluar de manera indirecta el efecto que tiene HilD o SirA en la expresión del gen cromosomal *hila*.

Por otro lado, en una cepa silvestre de *E. coli* K12 y en su derivada mutante Δ *uvrY::km*, la presencia de plásmidos que expresan HilD indujeron la expresión de la fusión *hila-cat*, a niveles incluso mayores que su expresión en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* (Fig. 14). En contraste, la presencia de plásmidos que expresan SirA no tuvieron efecto sobre la fusión *hila-cat* en estas cepas (Fig. 14). La mutante Δ *uvrY::km*

se evaluó para descartar cualquier efecto que pudiera tener la presencia de UvrY en *E. coli*, ya que éste es un ortólogo de SirA (Johnston *et al.*, 1996) y, por lo tanto, podría cumplir el papel de éste para inducir la expresión de *hilA*.

En conjunto, estos resultados indicaron que hay una cascada de regulación en la que SirA activa la expresión de HilD, el cual a su vez induce la expresión de HilA.

Así, es posible que lo que se observó en el estudio donde se reportó que SirA se une a la región reguladora de *hilA* (Teplitski *et al.*, 2003) haya sido una interacción inespecífica de SirA. Alternativamente, SirA podría regular directamente la expresión de *hilA* en alguna condición ambiental diferente a la evaluada en este estudio.

Para confirmar la cascada de regulación formada por SirA y HilD, se determinó la expresión de una fusión transcripcional *hilD-cat* en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en sus derivadas mutantes *sirA::tet* y Δ *hilD::km*. Este análisis mostró que en la mutante *sirA::tet* la expresión de la fusión *hilD-cat* se disminuye alrededor de 50%, mientras que en la mutante Δ *hilD::km* su expresión se disminuye más del 95% (Fig. 15). Como una forma de corroborar el efecto de SirA en la expresión de *hilD*, se determinó también la expresión de la fusión *hilD-cat* en la cepa Δ *barA::km*. El gen *barA* codifica para la proteína cinasa de SirA, por lo cual podríamos esperar que una mutante en este gen tuviera el mismo fenotipo que la mutante Δ *sirA::tet*. Como muestra la figura 15, en la mutante Δ *barA::km* la expresión de la fusión *hilD-cat* se disminuyó de manera similar que en la mutante Δ *sirA::tet*. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios, en los que se muestra que HilD se autoregula positivamente (Olekhovich y Kadner, 2004) y que en ausencia de SirA se disminuye alrededor del 50% la expresión de una fusión *hilD-lacZ* (Ellermeier *et al.*, 2005). El hecho de que los plásmidos que expresan a HilD, bajo un promotor diferente al propio de *hilD*, sean capaces de restaurar la expresión de *hilA* en la cepa mutante Δ *sirA* (Figs. 11 y 13), sugiere que la regulación de SirA sobre HilD es a nivel transcripcional y no a nivel post-transcripcional.

Así, nuestros resultados, y los resultados de otros grupos, sugieren que SirA se requiere solamente para la expresión óptima a nivel transcripcional de *hilD*. Es posible que la propia autoregulación positiva de HilD genere y mantenga una concentración apropiada de este regulador, la cual, sin embargo, en ausencia de SirA no es suficiente para reconocer específicamente la región reguladora de *hilA* y así inducir su expresión. Se ha reportado que HilD induce la expresión de *hilA* al contrarrestar la represión mediada por H-NS sobre su promotor (Schechter y Lee, 2001; Olekhovich y Kadner, 2006). Esto hace más factible que se requiera de una concentración óptima de HilD para poder competir con H-NS por la unión sobre la región reguladora de *hilA*, y desplazar dicha represión. Así, el papel de SirA sería el promover un incremento en el nivel de HilD, suficiente para que este regulador sea capaz de contrarrestar la represión que ejerce H-NS sobre el promotor de *hilA*.

Lo anterior podría explicar lo que se observó en los perfiles de secreción de proteínas, en los que el plásmido que expresa HilD bajo el promotor *ara* (pBADHilD1), aún sin la inducción con arabinosa restaura el perfil de proteínas secretadas en la mutante Δ *sirA*, pero no lo hace en la mutante Δ *hilD* (Fig. 13). Debido a que en la mutante Δ *sirA* aún habría HilD, aunado a la expresión de escape que podría tener el

plásmido pBADHilD1, se llegaría a la concentración de HilD adecuada para inducir la expresión de *hilA*.

Sin embargo, en torno a estos resultados, no se puede descartar que las fusiones transcripcionales *hilD-cat* (este estudio) o *hilD-lacZ* (Ellermeier *et al.*, 2005) que se han usado para determinar la expresión de *hilD* en las cepas mutantes *sirA*, podrían no contener todos los elementos en *cis* de *hilD* que se requieran para su regulación por SirA. Así, estas fusiones podrían no estar reflejando la regulación transcripcional a la que estaría sujeto el gen cromosomal de *hilD*.

Para descartar lo anterior, y confirmar los resultados obtenidos con el análisis de la expresión de la fusión *hilD-cat*, se planeó comparar la expresión de la proteína HilD en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en su derivada mutante $\Delta sirA$. Para esto se marcó, en ambas cepas, el gen cromosomal *hilD* con una secuencia que codifica un epítipo FLAG, de manera que se expresara una fusión HilD-FLAG, la cual se puede detectar con anticuerpos anti-FLAG. Sin embargo, después de varios intentos no fuimos capaces de detectar la expresión de la proteína HilD-FLAG en la cepa silvestre (Fig. 16). En contraste, en los mismos experimentos de western blot se detectó la expresión de HilC-FLAG y SirA-FLAG, en cepas silvestres de *S. Typhimurium* en las cuales se marcaron los genes *hilC* y *sirA*, para ser usadas como controles (Fig. 16). Además, mediante un análisis de proteínas secretadas, observamos que la cepa que tiene *hilD* etiquetado presenta el fenotipo de la mutante $\Delta hilD$ (Fig. 17); es decir, que probablemente el epítipo de FLAG está afectando la función o la estabilidad de HilD o de su ARNm. A pesar de que la presencia del plásmido pBADHilD1, que expresa HilD, restauró la secreción de proteínas en la cepa que tiene *hilD* etiquetado, la proteína HilD-FLAG no pudo ser detectada (Figs. 17 y 18). Resultados similares se obtuvieron al marcar al gen *hilD* con una secuencia que codifica para un epítipo HA (datos no mostrados). Ya que el plásmido pBADHilD1, en realidad expresa a HilD etiquetada con 6 residuos de histidinas en su extremo carboxilo terminal (HilD-His), la cual sí es funcional (Figs. 13 y 17), estamos marcando el gen cromosomal *hilD* con una secuencia que codifica 6 residuos de histidinas. Así, esperamos poder detectar la expresión de la proteína HilD-His funcional en las cepas silvestre y mutante $\Delta sirA$ por medio de experimentos de western blot, utilizando un anticuerpo anti-His. Además, se tiene planeado detectar por experimentos de “primer extensión” y RT-PCR la expresión del ARNm de *hilD* en estas dos cepas. Con esto podremos determinar con claridad si SirA tiene un papel solamente de modulador positivo en la expresión de *hilD*.

Se ha reportado que SirA forma un sistema de dos componentes con BarA, una proteína cinasa que se propone es la encargada de la detección de señales ambientales que regulan la expresión de los genes de SPI-1 (Lawhon *et al.*, 2002). Además, se ha mostrado que BarA fosforila a SirA y que la fosforilación incrementa la afinidad de unión a DNA de SirA sobre las regiones reguladoras de *hilA* y *hilC* (Altier *et al.*, 2000; Teplitski *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que disminuye en forma similar la expresión de las fusiones *hilC-cat*, *hilD-cat* y *hilA-cat* en las mutantes $\Delta barA::km$ y $\Delta sirA::km$, con respecto a su expresión en la cepa silvestre (Figs. 15, 19 y 20). Esto indica que SirA requiere de su cinasa BarA para regular la expresión de *hilC*, *hilD* y *hilA*.

Así mismo, nuestros resultados de las figuras 21 y 22 muestran que SirA y HilD se requieren para la expresión de *hilC* y *rtsA*, ya que la expresión de las fusiones *hilC-cat* y *rtsA-cat* se reduce drásticamente en ambas cepas mutantes $\Delta hilD::km$ y $\Delta sirA::km$ con respecto a su expresión en la cepa silvestre. Se ha reportado que SirA regula directamente a *hilC*, al unirse a su región reguladora (Teplitski *et al.*, 2003). Sin embargo, ya que en este estudio determinamos que SirA y HilD regulan en cascada la expresión de *hilA*, investigamos si este mismo mecanismo en cascada regula la expresión de *hilC* y *rtsA*. Para definir esto, se determinó la expresión de las fusiones transcripcionales *hilC-cat*, *rtsA-cat* y *hilD-cat* en cepas de *E. coli* que contienen un plásmido que expresa SirA o HilD. La presencia del plásmido que expresa HilD incrementó la expresión de las fusiones *hilD-cat*, *hilC-cat* y *rtsA-cat* (Figs. 24, 25 y 26). En contraste, la presencia del plásmido que expresa SirA no tuvo efecto en dicha expresión (Figs. 24, 25 y 26). Estos resultados indican que SirA regula la expresión de *hilC* y *rtsA*, a través de HilD y no directamente. Es posible entonces que, al igual que para *hilA*, en el estudio donde se reportó que SirA se une a la región reguladora de *hilC* (Teplitski *et al.*, 2003) se haya observado una interacción inespecífica de SirA. Alternativamente, SirA podría regular directamente la expresión de *hilC* y/o *rtsA* en alguna condición ambiental diferente a la evaluada en este estudio.

De manera interesante, la fusión *hilD-cat* se expresó a un nivel de alrededor del 50% en la cepa silvestre de *E. coli* o en su derivada mutante $\Delta uvrY::km$, con respecto a su expresión en la cepa silvestre de *S. Typhimurium*; en contraste, en la mutante $\Delta hilD::km$ de *S. Typhimurium* su nivel de expresión fue de 5% (Figs. 15, 23 y 26). La expresión de esta fusión en la mutante de $\Delta uvrY::km$ de *E. coli* descarta un posible efecto de UvrY, el homólogo de SirA presente en *E. coli*. Así, estos resultados sugieren la existencia de un regulador de *Salmonella* que reprime la expresión de *hilD*. Así, al no estar presente este probable represor en *E. coli* se libera la expresión de *hilD*. Probablemente la función de SirA sea contrarrestar el efecto de este represor para permitir la autoregulación de HilD.

Por otro lado, estudios previos han reportado que HilD, HilC y RtsA son capaces de autoregularse y de regularse entre ellos (Oleknovich y Kadner, 2004; Ellermeier *et al.*, 2005). En uno de estos estudios, se ha reportado que en una triple mutante $\Delta hilD::km \Delta hilC::km \Delta rtsA::km$ de *S. Typhimurium*, la presencia de un plásmido multicopia que expresa HilD, HilC o RtsA, induce la expresión de fusiones transcripcionales *hilD-lacZ*, *hilC-lacZ* y *rtsA-lacZ* (Ellermeier *et al.*, 2005). Con base en estos resultados, se ha propuesto la existencia de un circuito de regulación conformado por HilD, HilC y RtsA, en el que estos reguladores son capaces de autoregularse y de regularse entre sí mismos; además, cada uno puede inducir independientemente la expresión de *hilA* (Ellermeier *et al.*, 2005). Sin embargo, como indican nuestros resultados de la figura 10, la expresión de *hilA* se afecta en una cepa mutante $\Delta hilD$, pero no en cepas mutantes $\Delta hilC$ o $\Delta rtsA$. Además, mientras que en la mutante $\Delta hilD::km$ se afecta la expresión de las fusiones *hilD-cat*, *hilC-cat* y *rtsA-cat*, en las mutantes $\Delta hilC::km$ y $\Delta rtsA::km$ no se afecta la expresión de ninguna de estas fusiones (Figs. 21, 22 y 23). Esto indica que, en las condiciones ambientales que se usan comúnmente para estudiar la expresión de los genes de SPI-1, HilC y RtsA no se requieren para la expresión de *hilA*, *hilD*, *hilC* o *rtsA*.

Dado que HilD, HilC y RtsA son proteínas homólogas, que pertenecen a la misma familia de reguladores transcripcionales, AraC/XylS, podrían llegar a reconocer

secuencias similares en los genes que regulan. Así, al ser sobre-expresados, estos reguladores podrían unirse a secuencias que no reconocerían a las concentraciones fisiológicas que alcanzan normalmente. Esto podría explicar porqué al ser sobre-expresados, los tres reguladores pueden inducir independientemente su propia expresión así como la de los otros dos reguladores (Ellermeier *et al.*, 2005). Se ha demostrado que plásmidos que contienen a *hilC* restauran la expresión de los genes SPI-1 en una mutante en $\Delta hilD$, de manera similar a como lo hacen plásmidos que llevan a *hilD* (Oleknovich y Kadner, 2004). Sin embargo, no se puede descartar que bajo alguna condición ambiental, diferente a las condiciones comúnmente usadas para estudiar la expresión de los genes de SPI-1, pueda existir el circuito de regulación entre HilD, HilC y RtsA, que se ha propuesto en otros estudios.

La función que podrían tener HilC y RtsA en la patogénesis o fisiología de *Salmonella*, no es clara. Nuestros resultados son consistentes con reportes que indican que mutaciones en *hilC* afectan sólo ligeramente la expresión de los genes de SPI-1 y el fenotipo de invasión a células epiteliales en cultivo de *Salmonella*, mientras que mutaciones en *hilD* afectan drásticamente ambas cosas (Eichelberg *et al.*, 1999; Schechter *et al.*, 1999). Esto debido a que en la mutante $\Delta hilD$ no estarían presentes ni HilD ni HilC, mientras que en la mutante $\Delta hilC$ habría HilD, según nuestros resultados. Por otro lado, se ha reportado que RtsA regula al gen *dsbA* que codifica una isomerasa periplásmica de puentes disulfuro y al gen *slrP*, necesario para la colonización de las placas de Peyer en el modelo murino. Además, se ha reportado que RtsB, que se expresa en operón con RtsA, reprime la expresión de genes flagelares (Ellermeier y Slauch, 2003; Ellermeier y Slauch, 2004). Sin embargo aún no hay reportes que aclaren cuál es el papel en virulencia de los genes regulados por RtsA/B.

Hasta hace poco se había adoptado como dogma que la expresión de SPI-1 y SPI-2 es diferencial, dándose en etapas diferentes de la patogénesis de *Salmonella* y, por lo tanto, respondiendo a diferentes señales ambientales tanto *in vivo* como *in vitro*. Así, se ha adoptado que los genes de SPI-1 se expresan en la fase extracelular de *Salmonella*, es decir, antes de que invada las células intestinales, lo cual es consistente con su papel en la invasión celular (Galán y Curtís, 1989; Ochman *et al.*, 1996), mientras que los genes de SPI-2 se expresan una vez que la bacteria ha invadido las células, dentro de la vacuola donde reside la bacteria (Shea *et al.*, 1996; Hensel *et al.*, 1998).

Sin embargo, recientemente, en nuestro grupo de investigación se encontró que, contrario a lo reportado previamente, los genes de SPI-2 se pueden expresar cuando se crece a *Salmonella* en el medio de cultivo LB, lo cual es una condición que se emplea comúnmente para estudiar la expresión de los genes de SPI-1 (Bustamante *et al.*, datos no reportados). Sin embargo, mientras que la máxima expresión de los genes de SPI-1 se obtiene al final de la fase exponencial de crecimiento en LB, la expresión óptima de los genes de SPI-2 se observa en una etapa muy tardía de la fase de crecimiento (Fig. 6). De manera interesante, en esta condición de crecimiento, la expresión de los genes de SPI-2 depende de SsrB y OmpR, que previamente se han involucrado en su regulación (Lee *et al.*, 2000a; Feng *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2004), pero también de HilD y SirA (Fig. 7). Así, estos dos últimos reguladores estarían coordinando la expresión de los genes de SPI-1 y de SPI-2. Esto representa un mecanismo novedoso de regulación de genes de virulencia de *Salmonella*, así mismo, revela que existe una comunicación a

nivel transcripcional entre las dos islas de patogenicidad más importantes de esta bacteria.

Para comenzar a definir de qué manera los reguladores SirA y HilD estarían involucrados en la expresión de los genes de SPI-2, se analizó el efecto de estos reguladores sobre la expresión de SsrB, el regulador principal de SPI-2. En la figura 27 se muestra que la expresión de SsrB disminuye drásticamente en las mutantes $\Delta hilD::km$, $\Delta sirA::km$ y $\Delta ompR::km$; pero no se afecta en las mutantes $\Delta hilA::km$ y $\Delta hilC::km$. Este resultado reveló que ambos reguladores, HilD y SirA, regulan la expresión de los genes de SPI-2, a través de controlar la expresión de SsrB. Así mismo, indican que el regulador OmpR, el cual forma parte del sistema de dos componentes EnvZ/OmpR que regula los genes de SPI-2 intracelularmente, también está involucrado en la expresión de genes de SPI-2 en medio LB. Cabe señalar que HilA, el regulador central de los genes de SPI-1, cuya expresión depende de HilD, no se requiere para la expresión de SsrB.

Para determinar si, al igual que para *hilA*, SirA y HilD regulan en cascada la expresión de SsrB, se analizó la expresión de SsrB en las cepas mutantes $\Delta hilD::km$ y $\Delta sirA::km$ que contienen un plásmido que expresa HilD o SirA. Este análisis indicó que HilD no requiere de SirA para inducir la expresión de SsrB, mientras que SirA si requiere de HilD para inducir dicha expresión (Fig. 28). Así, la cascada de regulación formada por SirA y HilD controla la expresión de HilA y SsrB, los reguladores centrales de la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, respectivamente.

En la figura 31 se muestra un modelo de regulación que resume los resultados obtenidos en este y otros estudios reportados. En nuestro modelo proponemos que BarA se autofosforila, en respuesta a señales del medio ambiente, y fosforila a SirA. Las señales ambientales que podría detectar BarA aún no han sido identificadas. Una vez fosforilada, la proteína SirA incrementa la expresión de HilD, que al alcanzar una concentración óptima, es capaz de incrementar su propia expresión e inducir la expresión de HilA, HilC y RtsA. Para el caso de *hilA*, se conoce que HilD contrarresta la represión que ejerce H-NS sobre el promotor de este gen (Olekhnovich y Kadner, 2006). La expresión de RtsA, permitiría la expresión de otros genes localizados fuera de SPI-1, como *dsbA* y *slrp* (Ellermeier y Slauch, 2004). Es probable que en alguna condición ambiental se encienda el circuito de regulación formado por HilD, HilC y RtsA, el cual serviría para amplificar la señal que induce la expresión de *hilA*. Una vez que se expresa, HilA induce directamente la expresión de algunos genes de SPI-1, entre ellos, el que codifica para InvF, el regulador que induce la expresión del resto de los genes de SPI-1 (Bajaj *et al.*, 1995). HilD, HilC, RtsA e InvF, al igual que la mayoría de los miembros de la familia AraC/XylS, tendrían la capacidad de detectar señales ambientales. Esto haría que los genes de SPI-1 se expresen sólo cuando la bacteria detecte múltiples señales ambientales, lo cual le permitiría expresar estos genes en el nicho y momento adecuado dentro de su hospedero.

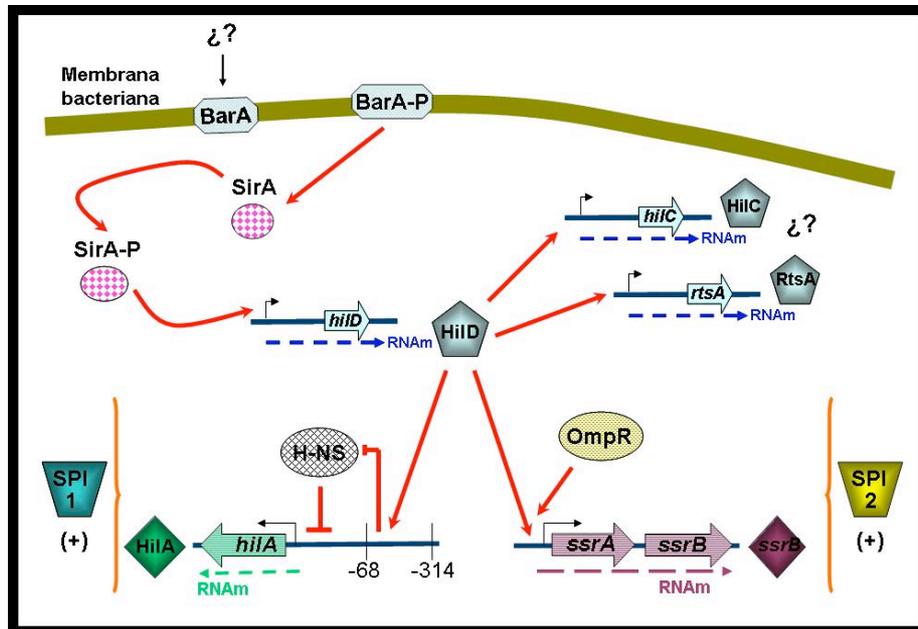


Fig. 31. Modelo para la regulación de *hilA* (SPI-1) y *ssrB* (SPI-2)

Dado que hemos observado que los genes de SPI-1 y SPI-2 se expresan en diferentes fases del crecimiento de *S. Typhimurium* en el medio de cultivo LB, es probable que exista un mecanismo que reprima la expresión de *HilA* y, de esta manera, apague la expresión de los genes de SPI-1. Se han descrito varios represores para *hilA*, como el propio regulador *HilA*, *H-NS* y *Hha* (Fahlen *et al.*, 2001; Schechter *et al.*, 2003; De Keersmaecker *et al.*, 2005). Sin embargo, la presencia de *HilD* se mantendría, ya sea porque esta proteína sea muy estable o porque su expresión se siga induciendo por *SirA*, después de que la expresión de *HilA* se reprima. *HilD* podría detectar una señal ambiental que modifica su afinidad de manera que pueda unirse a la región reguladora de *ssrA/B* y no a la de *hilA*, esto probablemente por un mecanismo similar al efecto que tiene la arabinosa sobre el regulador *AraC*, para controlar la expresión del operón *araBAD* (Lobell y Schleif, 1990). Así, *HilD* y *OmpR* inducen la expresión del sistema de dos componentes *SsrA/B*. La expresión de los genes de SPI-2 podría depender de la presencia de señales ambientales que activen a *HilD* y a los sistemas de dos componentes *EnvZ/OmpR* y *SsrA/B*, cuando se crece a *Salmonella* en medio LB.

Nosotros estamos interesados en definir cuál es el papel que tiene la regulación que ejercen *SirA* y *HilD* sobre la expresión de los genes de SPI-2, en la patogénesis de *Salmonella*. En el humano, *Salmonella* causa dos tipos de infecciones, la fiebre tifoidea, producida por *S. Typhi* y la infección intestinal localizada, producida por varios serotipos de *Salmonella*, principalmente *S. Typhimurium* (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000; García-del Portillo, 2001; Levine *et al.*, 2001). Para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis de *Salmonella* se han analizado las infecciones de *S. Typhimurium* en diferentes modelos animales, como el ratón o el bovino, para estudiar la infección sistémica y la intestinal, respectivamente. Esto debido a que la enfermedad que se presenta en los ratones por *S. Typhimurium* es únicamente

sistémica, mientras que la que este serotipo causa en los bovinos, es únicamente intestinal. Así mismo, se han empleado cultivos de macrófagos o de células epiteliales, para estudiar la replicación intracelular de *Salmonella* y su mecanismo de invasión, mediados por genes de SPI-2 y SPI-1, respectivamente.

Así, mutantes en genes de SPI-1 están severamente afectadas en la invasión a células epiteliales en cultivo y presentan atenuación en el modelo bovino para producir la infección gastrointestinal (Galán y Curtis, 1989; Ochman *et al.*, 1996). Mientras que, mutantes en genes de SPI-2 están afectadas en su capacidad de replicarse dentro de macrófagos y presentan una atenuación drástica en la producción de la infección sistémica en el ratón (Shea *et al.*, 1996; Hensel *et al.*, 1998). Consistente con esto, se ha observado que al entrar *Salmonella* a los macrófagos o a las células epiteliales se induce la expresión de los genes de SPI-2 y se reprime la expresión de los genes de SPI-1 (Hansen-Wester y Hensel, 2001).

Dado que hemos encontrado que la cascada de regulación formada por SirA y HilD participa en la regulación de los genes de ambas islas, nos preguntamos cuál sería la relevancia de la regulación de los genes de SPI-2 mediada por estos reguladores, en la virulencia de *Salmonella*. Para comenzar a definir esto, se comparó la capacidad que tienen de sobrevivir y de replicarse en el ratón la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y su derivada mutante $\Delta sirA::km$. Como un control, también se comparó la sobrevivencia entre la cepa silvestre y su derivada mutante $\Delta ssrB::km$; el gen *ssrB* codifica para el regulador central de los genes de SPI-2. Para esto, se determinó lo que se conoce como índice de competencia (IC), en el que se obtiene un cociente del número de bacterias de la cepa silvestre entre el número de bacterias de la cepa mutante que se inocularon y que se recuperaron de los órganos (hígado y bazo) del ratón. Así, un IC de 1 significa que ambas cepas, silvestre y mutante, sobreviven y se replican igual en el ratón. La obtención de un IC nos permite comparar el grado de virulencia que presentan dos cepas de *Salmonella* en el mismo ratón, de esta manera se evita la variación que existe entre los ratones a la susceptibilidad de la infección por *Salmonella*. La inoculación de los ratones con la mezcla de bacterias, silvestre y mutante se realizó por vía oral (VO) y por vía intraperitoneal (VIP).

Nuestros resultados indicaron que la mutante $\Delta sirA::km$ no presenta atenuación en su grado de virulencia en el modelo de ratón, por ninguna de las dos vías de inoculación (Figs. 29 y 30, Tablas 6 y 7), ya que los valores obtenidos de los IC fueron muy cercanos a 1 (1.46 por VO y 0.391 por vía IP). En contraste, la mutante $\Delta ssrB::km$ estuvo severamente atenuada por ambas vías de inoculación, lo cual se refleja claramente en los valores del IC que se obtuvieron para esta cepa, que fueron del orden de 10^{-6} por VO y 10^{-4} por vía IP (Figs. 29 y 30, Tablas 6 y 7.). En otro estudio se observó también sólo un efecto moderado de atenuación en la virulencia de una mutante $\Delta sirA$, evaluada por la determinación de la dosis letal media, en ratones inoculados vía oral (Ahmer *et al.*, 1999). En contraste, al igual que en nuestro estudio, se ha reportado que la mutante $\Delta ssrB::km$ está severamente atenuada en su virulencia en el ratón, al inocularse tanto VO como VIP (Shea *et al.*, 1996).

En un estudio previo se reportó que los genes de SPI-1 son necesarios para la virulencia de *S. Typhimurium* cuando se inocula por vía oral (VO) en ratones, mientras que los genes de SPI-2 se requieren cuando esta bacteria se inocula por vía intraperitoneal (Galán y Curtis, 1989). Sin embargo, estudios más recientes, incluyendo

resultados en nuestro laboratorio, han mostrado que diferentes mutantes en genes de SPI-1, como cepas que carecen del gen que codifica para HilA o HilD, o incluso, que carecen de toda la SPI-1, no están atenuadas en el modelo de ratón (Ahmer et al., 1999; Bustamante *et al.*, datos no publicados). En contraste, mutantes en genes de SPI-2, como cepas que carecen del gen que codifica para SsrB, están severamente atenuadas en este modelo de estudio (Shea *et al.*, 1996; este estudio, Figs. 29 y 30, Tablas 6 y 7).

Así, en el modelo murino los genes de SPI-1 no parecen tener un papel tan importante como los genes de SPI-2, en la infección sistémica por *Salmonella*. Por el contrario, en bovinos, los genes de SPI-1 son más importantes que los genes de SPI-2 para la producción de diarrea por *Salmonella* (Ahmer et al., 1999). Estos resultados indican que el modelo del ratón es adecuado para el estudio de la enfermedad sistémica producida por *S. Typhimurium*, pero no para el estudio de la enfermedad intestinal.

Lo anterior podría deberse a que en el ratón, la invasión de *Salmonella* al epitelio intestinal se da principalmente a través de las células M (Jones *et al.*, 1994), que son células especializadas capaces de realizar fagocitosis, por lo que la bacteria no requeriría de los genes de SPI-1 para invadir. Mientras que en bovinos, *Salmonella* es capaz de invadir tanto las células M como los enterocitos (Santos *et al.*, 2001); sin embargo, dado que las células M ocupan solamente el 0.01% del intestino, los enterocitos tienen un papel primordial en este modelo animal y al no ser éstos células capaces de realizar fagocitosis, la presencia de los genes de SPI-1 es indispensable para la invasión. Así, una mutante *sirA* de *Salmonella* está afectada en la virulencia en el modelo de bovino, pero no en el modelo de ratón (Ahmer *et al.*, 1999).

En conjunto, nuestros resultados indican que SirA y HilD no se requieren para la expresión de los genes de SPI-2 durante la infección sistémica de *Salmonella*. Sin embargo, recientemente se reportó que los genes de SPI-2 también son necesarios en las primeras etapas de la infección por *Salmonella* y que se expresan también en el intestino, antes de la invasión al epitelio intestinal (Brown et al., 2005). Además, en otro estudio se encontró que los genes de SPI-2 se requieren para que se lleve a cabo la infección intestinal completa, que involucra la persistencia de la infección entérica y la respuesta inflamatoria (enteritis) (Coburn *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que los genes de SPI-2 podrían expresarse por dos mecanismos, que inducirían la expresión de SsrA/B en respuesta al menos a dos diferentes señales ambientales, probablemente en diferentes nichos dentro del hospedero durante la patogénesis de *Salmonella*.

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio han mostrado que SirA y HilD se requieren para la expresión de los genes de SPI-2 cuando se crece a *Salmonella* en medio de cultivo LB, una condición que parece mimetizar las condiciones extracelulares que encuentra esta bacteria durante una infección, ya que favorece la expresión de los genes de SPI-1. Sin embargo, SirA y HilD no se requieren para la expresión de los genes de SPI-2 cuando se crece a *Salmonella* en las condiciones que hasta la fecha han sido reconocidas como específicas para la inducción de los genes de SPI-2 (por ejemplo, medio mínimo con bajo magnesio), que se supone mimetizan las condiciones intracelulares que detecta esta bacteria durante una infección sistémica. Estos resultados han corroborado la existencia de dos mecanismos que pueden inducir la expresión del sistema SsrA/B, y por lo tanto de los genes de SPI-2, en respuesta a diferentes señales ambientales (Fig. 32). Uno de estos, induce la expresión de los genes de SPI-2 para permitir la replicación de *Salmonella* dentro de las células del hospedero, y se requiere

por lo tanto para la enfermedad sistémica. Este mecanismo es evidente cuando se crece a *Salmonella* en medio mínimo y requiere de los sistemas de dos componentes EnvZ/OmpR, PhoP/PhoQ y al regulador SlyA (Deiwick *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000a; Bijisma y Groisman, 2005; Linehan *et al.*, 2005). Nosotros proponemos que el otro mecanismo, que requiere de SirA, HilD y el sistema EnvZ/OmpR, y que es evidente cuando se crece a *Salmonella* en LB, induce la expresión de los genes de SPI-2 cuando *Salmonella* se encuentra en el lumen del intestino, antes de la invasión al epitelio intestinal. Este último mecanismo podría ser importante para la función de los genes de SPI-2 en el intestino, que recientemente se propuso (Brown *et al.*, 2005; Coburn *et al.*, 2005), así como para el inicio de la adaptación de *Salmonella* hacia el ambiente intracelular.

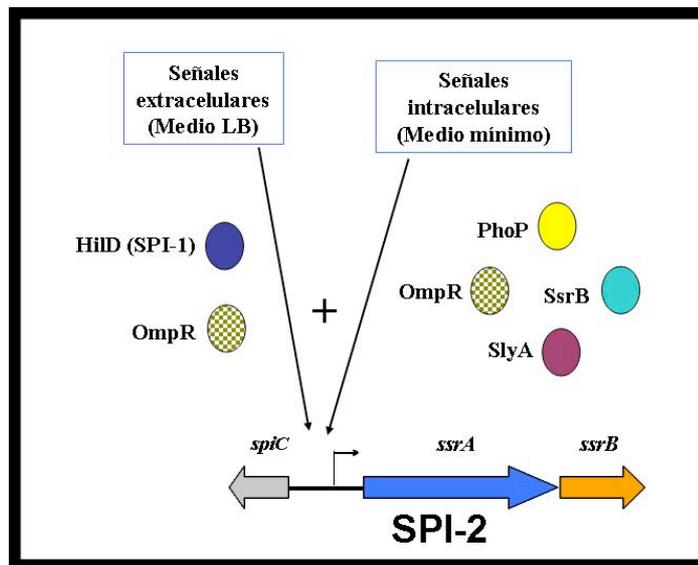


Fig. 32. Modelo para la regulación de SPI-2

En un estudio anterior, se reportó que una mutante $\Delta sirA$ de *S. Typhimurium* está severamente afectada en su grado de virulencia en el modelo de bovino (Ahmer *et al.*, 1999). Es probable que en esta mutante esté afectada la expresión tanto de los genes de SPI-1 como la de los genes de SPI-2. Así, el uso del modelo bovino nos podría permitir analizar el papel que tienen SirA y HilD en la expresión de los genes de SPI-2, durante la infección intestinal de *Salmonella*.

Para poder investigar lo anterior, primero queremos entender mejor el mecanismo por el cual HilD induce la expresión del operón *ssrA/B*, que codifica para el sistema central de regulación de los genes de SPI-2. Esto nos permitirá construir cepas de *S. Typhimurium* que tengan bloqueado el mecanismo de inducción de la expresión de *ssrA/B* mediada por HilD, pero que no afecten la expresión de *ssrA/B* por la vía independiente de HilD, o la expresión de *hilA*, que codifica para el regulador central de los genes de SPI-1. Una de las cosas que se tienen planeadas para esto, es definir el sitio de interacción de HilD sobre *ssrA/B*, para después modificar este sitio en el cromosoma de manera que HilD ya no lo reconozca. La caracterización del grado de virulencia de cepas de *S. Typhimurium* con este tipo de mutaciones, en modelos que permitan estudiar la infección intestinal de *Salmonella*, como el modelo bovino, nos permitirá definir el papel de HilD y SirA en la expresión de los genes de SPI-2 durante la patogénesis de la bacteria.

Nuestros resultados indican que SirA y Hild regulan en cascada los genes tanto de SPI-1 como de SPI-2, lo que revela un mecanismo novedoso de “cross-talk” en la regulación genética entre ambas islas. Los resultados que hemos generado en este estudio ayudarán a definir los mecanismos moleculares que coordinan la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 y el papel de dichos mecanismos durante el establecimiento de una infección por *Salmonella*. Esto permitirá entender mejor los mecanismos que reprograman la expresión genética en *Salmonella*, para pasar de ser un patógeno extracelular invasivo a ser un patógeno que sobrevive en macrófagos en un ambiente intracelular. Además, esto también podría ayudarnos a entender cómo las bacterias patógenas han evolucionado para expresar sus factores de virulencia en respuesta a señales particulares del hospedero, las cuales les ayudan a definir el nicho específico donde habrán de establecer una infección exitosa.

6. PERSPECTIVAS

Para completar los resultados que nos permitan someter un artículo a publicación, pretendemos realizar los siguientes experimentos:

1- Se marcará el gen cromosomal *hilD* con una secuencia que codifique para 6 residuos de histidinas en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en su derivada mutante Δ *sirA*. En estas cepas se analizará la expresión de la proteína Hild-His, mediante experimentos de western blot, utilizando un anticuerpo anti-His. Además, se detectará también, mediante experimentos de “primer extension”, la expresión del RNAm de *hilD*. Esto permitirá corroborar el efecto que tiene la ausencia de SirA sobre la expresión de Hild.

2- Se purificará la proteína SirA y la región citoplásmica de la proteína BarA mediante una etiqueta de histidinas, empleando columnas de afinidad hacia níquel. La proteína SirA será fosforilada *in vitro* con la proteína BarA, la cual se autofosforila y transfiere el grupo fosfato a SirA. Con la proteína SirA fosforilada o sin fosforilar, se realizarán experimentos de interacción proteína/DNA sobre las regiones reguladoras de *hilD* y *hilA*, mediante experimentos de retardamiento en gel y “footprinting”.

Por otro lado, con el fin de seguir elucidando el mecanismo por medio del cual el sistema de dos componentes BarA/SirA ejerce su papel dentro de la regulación de los genes en *Salmonella*, se pueden abordar los siguientes puntos:

1- Determinar qué otros genes se encuentran regulados por SirA y analizar cuál es el papel que estos tienen dentro del regulón SirA y dentro de la patogénesis de *Salmonella*. Esto puede realizarse mediante microarreglos en los que se analice la expresión de diversos genes en una mutante *sirA* y en la cepa silvestre de *Salmonella Typhimurium*.

2- Con el fin de elucidar los reguladores que, además de BarA, controlen la expresión de SirA, se puede analizar la expresión de este regulador en un banco de mutantes en los genes de *Salmonella Typhimurium*

APÉNDICE

Preparación de geles de agarosa

- ✓ Ensamblar la cámara de electroforesis.
- ✓ Preparar el gel de agarosa al 1% en buffer TAE al 0.5%, vaciarlo, colocar el peine y esperar a que solidifique.
- ✓ Las muestras se corren a 80 volts en buffer TAE al 1%.

Purificación de ADN utilizando el kit “Gene clean” de Bio101

- ✓ Cortar las bandas de ADN del gel de agarosa.
- ✓ Agregar 3 volúmenes de NaI (~500 µl).
- ✓ Incubar a 55°C hasta que se disuelva la agarosa.
- ✓ Agregar 6 µl de “glassmilk” y agitar con vórtex.
- ✓ Incubar en hielo ~30 min; agitar continuamente moviendo el tubo.
- ✓ Centrifugar 1 min a 14000 rpm.
- ✓ Desechar el sobrenadante.
- ✓ Agregar 700 µl de “new wash” y resuspender con la pipeta lentamente.
- ✓ Centrifugar 1 min a 14000 rpm.
- ✓ Lavar una vez más con “new wash” de la misma manera.
- ✓ Secar bien las pastillas.
- ✓ Agregar 40 µl de agua y resuspender con la pipeta.
- ✓ Incubar 5 min a 55°C.
- ✓ Centrifugar 1 min a 14000 rpm
- ✓ Tomar el sobrenadante y transferirlo a un tubo nuevo evitando tomar la pastilla.
- ✓ Centrifugar de nuevo 1 min a 14000 rpm y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo. De esta manera se asegura que no haya quedado sílica.

Precipitación de ADN con butanol

- ✓ Agregar 1 ml de butanol.
 - ✓ Mezclar.
 - ✓ Centrifugar durante 5 min a 14000 rpm.
 - ✓ Desechar el sobrenadante con una jeringa.
 - ✓ Agregar 500 µl de etanol al 70%.
 - ✓ Mezclar.
 - ✓ Centrifugar durante 5 min a 14000 rpm.
 - ✓ Desechar el sobrenadante.
 - ✓ Secar la pastilla
 - ✓ Resuspender en 15-20 µl de agua.
-
-

Precipitación de ADN plasmídico con glicógeno

- ✓ Añadir 1 µl de glicógeno (20mg/ml)
- ✓ Añadir 500 µl de etanol al 100%.
- ✓ Incubar 30 min a -20°C.
- ✓ Centrifugar durante 15 min a 14000 rpm.
- ✓ Desechar el sobrenadante.
- ✓ Lavar una vez con 700 µl de etanol al 70%.
- ✓ Centrifugar durante 15 min a 14000 rpm.
- ✓ Desechar el sobrenadante.
- ✓ Secar las pastillas.
- ✓ Resuspender en 10 µl de agua.
- ✓ Se utilizan 5 µl para realizar la transformación.

Purificación de plásmidos por miniprep

- ✓ Hacer una pastilla de células con el cultivo hecho el día anterior -en 5ml de medio LB, incubado toda la noche a 37°C en agitación con antibióticos para los cuales sea resistente la cepa- centrifugando 2 min a 13000 rpm sucesivamente.
 - ✓ Resuspender la pastilla en 150 µl de buffer SET.
 - ✓ Agregar 8 µl de RNAsa (10 mg/ml)
 - ✓ Incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
 - ✓ Agregar 400 µl de solución salina (NaOH 0.2 M/SDS 1%). Mezclar.
 - ✓ Incubar 5 min en hielo.
 - ✓ Agregar 300 µl de acetato de amonio 7.5M pH 7.8. Mezclar.
 - ✓ Incubar 10 min en hielo.
 - ✓ Centrifugar 10 min a 12000 rpm.
 - ✓ Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo.
 - ✓ Agregar 0.6 volúmenes (~500 µl) de isopropanol. Mezclar.
 - ✓ Incubar 10 min a temperatura ambiente.
 - ✓ Centrifugar 10 min a 14000 rpm.
 - ✓ Desechar el sobrenadante
 - ✓ Agregar 1 ml de etanol al 70%.
 - ✓ Centrifugar 10 min a 14000 rpm.
 - ✓ Desechar el sobrenadante.
 - ✓ Secar bien.
 - ✓ Resuspender en 50-100 µl de agua
-
-

Purificación de plásmidos con columnas (High Pure Plasmid Isolation Kit de Qiagen)

Hacer una pastilla de células con un cultivo en 5 ml de medio LB, crecido durante toda la noche a 37°C en agitación con antibióticos para los cuales sea resistente la cepa.

- ✓ Resuspender la pastilla en 250 µl de buffer P1/RNAsa.
- ✓ Agregar 250 µl de buffer de lisis. Mezclar e incubar 5 min a temperatura ambiente.
- ✓ Agregar 350 µl de “binding buffer”. Mezclar e incubar 5 min en hielo.
- ✓ Centrifugar 10 min a 14000 rpm.
- ✓ Insertar una columna (filtro) en un tubo de colección. Transferir el sobrenadante al reservorio superior de la columna.
- ✓ Centrifugar durante 1 min a 14000 rpm.
- ✓ Desconectar el filtro, desechar el sobrenadante. Reconectar el filtro y agregar 500 µl de buffer de lavado I.
- ✓ Centrifugar durante 1 min a 14000 rpm.
- ✓ Desconectar el filtro, desechar el sobrenadante. Reconectar el filtro y agregar 700 µl del buffer de lavado II.
- ✓ Centrifugar durante 1 min a 14000 rpm.
- ✓ Desconectar el filtro, desechar el sobrenadante. Reconectar el filtro y centrifugar de nuevo durante 1 min a 14000 rpm para remover el buffer de lavado residual.
- ✓ Transferir el filtro a un tubo eppendorf de 1.5 ml y agregar 100 µl de buffer de elusión.
- ✓ Centrifugar durante 30 s a 14000 rpm.
- ✓ Desechar el filtro.

Purificación de PCR's y digestiones con columnas (PCR Purification Kit de Qiagen)

- ✓ Agregar 5 volúmenes de buffer PBI a 1 volumen del producto de PCR o de las digestiones.
 - ✓ Insertar una columna (filtro) en un tubo de colección. Transferir el sobrenadante al reservorio superior de la columna.
 - ✓ Centrifugar durante 1 min a 14000 rpm
 - ✓ Desconectar el filtro, desechar el sobrenadante. Reconectar el filtro y agregar 750 µl del buffer PE.
 - ✓ Centrifugar durante 1 min a 14000 rpm
 - ✓ Desconectar el filtro, desechar el sobrenadante. Reconectar el filtro y centrifugar de nuevo durante 1 min a 14000 rpm para remover el buffer residual.
 - ✓ Transferir el filtro a un tubo eppendorf de 1.5 ml y agregar 50 µl de buffer de elusión.
 - ✓ Centrifugar durante 30 s a 14000 rpm.
 - ✓ Desechar el filtro.
-
-

Preparación de células competentes para electroporación

- ✓ Preparar un cultivo de la cepa deseada en 5 ml de LB adicionado con los antibióticos para los cuales tiene resistencia la cepa, e incubarlo toda la noche a 37°C en agitación.
- ✓ Transferir 1 ml del inóculo incubado toda la noche, a un matraz con 100 ml de LB adicionado con los antibióticos adecuados.
- ✓ Incubar a 37°C en agitación hasta obtener una DO_{600nm} de 0.6/~3 horas.
- ✓ Transferir a tubos de Nalgene de 50 ml. Centrifugar durante 10 min a 6000 rpm.
- ✓ Desechar el sobrenadante y agregar 30 ml de agua milli-Q fría estéril. Centrifugar durante 10 min a 6000 rpm.
- ✓ Desechar el sobrenadante y agregar 30 ml de glicerol frío al 10%. Centrifugar durante 10 min a 6000 rpm.
- ✓ Desechar el sobrenadante y resuspender en glicerol al 10% de acuerdo al tamaño de la pastilla (200-400 μ l).

Electroporación

A 40 μ l de células competentes de cada una de las cepas empleadas, se les agregan de 10-100 ng de ADN plasmídico, o 5 μ l de las ligaciones. La mezcla se coloca en una celda para electroporación y se electropora dando un pulso eléctrico de 2.5 kV durante 5.5 ms en un aparato “*E. coli* pulser” (BIORAD).

Las células son transferidas a tubos de ensaye que contiene 1 ml de medio SOC (2g de bacto triptona, 0.5 g de extracto de levadura, 200 μ l de NaCl, 250 μ l de KCl 1 M, 1 ml de MgSO₄ 1 M y 0.36 g de glucosa, aforado a 200 ml con agua desionizada) y se incuban durante una hora a 37°C en agitación a 200 rpm.

Posteriormente se siembran en cajas con medio LB con 1.5% de agarosa adicionado con los antibióticos para los cuales sea resistente la cepa, y que permiten la selección de ésta.

Preparación de geles de poliacrilamida

- ✓ Ensamblar la cámara de electroforesis
- ✓ Preparar el gel inferior, vaciarlo en la cámara y esperar a que solidifique (~40 min).
- ✓ Preparar el gel superior, vaciarlo en la cámara, colocar el peine y esperar a que solidifique (~40 min).
- ✓ Las muestras se corren a 30 mA en buffer Tris-Glicina

✓ Gel inferior

| | 15% | 10% | 12% |
|--------------------------|------------|--------------|--------------|
| Archilamida 30%/Bis 0.8% | 10 ml | 6.66 ml | 8 ml |
| Tris.HCl/SDS pH 8.8 | 5 ml | 5 ml | 5 ml |
| Agua | 5 ml | 8.34 ml | 7 ml |
| PSA 10% | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| TEMED | | <u>14 µl</u> | <u>14 µl</u> |
| | 20 ml | 20 ml | 20 ml |

✓ Gel superior

| | |
|--------------------------|--------------|
| Archilamida 30%/Bis 0.8% | 1.5 ml |
| Tris.HCl/SDS pH 6.8 | 2.5 ml |
| Agua | 6 ml |
| PSA 10% | 50 µl |
| TEMED | <u>10 µl</u> |
| | 10 ml |

✓ Buffer Tris-Glicina

| | |
|------------|-------------|
| Glicina 4X | 250 ml |
| SDS 20% | 5 ml |
| Agua | cbp 1 litro |

Buffer de transferencia

Para 1 litro:

| | |
|---------------|------------------|
| 48 mM Tris | 5.82 g Tris Base |
| 39 mM Glicina | 2.93 g glicina |
| 0.375 % SDS | 3.75 ml 10% SDS |
| 20 % MeOH | 200 ml MeOH |

Buffer PBS 10X

Para 1 litro:

- ✓ 2.03 g NaH₂PO₄-H₂O
- ✓ 11.49 g NaHPO₄
- ✓ 85 g NaCl

Ajustar el pH a 6.8

Buffer PBS-Tween (PBS-T)

Para 1 litro:

- ✓ PBS 10X 100 ml
- ✓ Tween-20 3 ml

Solución bloqueadora

- ✓ Leche Carnation sin grasa 50 g
- ✓ PBS 10X 100 ml
- ✓ Tween-20 3 ml

Prepararla en el momento. Puede guardarse a 4° durante 1 semana.

Solución de lavado TDTT

Para 200 ml:

- ✓ Tris-HCl-pH 7.8 50mM
- ✓ Ditioneitol 30 μ M

Buffer SDS-PAGE

Para 320 ml:

| | | |
|----------------------|----|----|
| Tris-HCl-pH 7.5 | 10 | |
| Glicerol | | 64 |
| SDS 20% | 32 | |
| Bromofenol blue 0.5% | | 16 |



7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- **Ahmer BMM., Reeuwijk J., Watson PR., Wallis TS y Heffron F.** *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Mol Microbiol* 1999;31:971-982.
 - **Akbar S., Schechter LM., Lostroh CP., Lee CA.** AraC/XylS family members, HilD and HilC, directly activate virulence gene expression independently of HilA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 2003;47:715-728.
 - **Altier C., Suyemoto M., Ruiz AI., Burnham KD., Maurer R.** Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Mol Microbiol* 2000;35:635-646.
 - **Altier C.** Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* 2002;43:85-92.
 - **Arai T., Hiromatsu K., Nishimura H., Kimura Y., Kobayashi N., Ishida H., Nimura Y., Yoshikai Y.** Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during *Salmonella* infection. *Bioch Biophys Res Commun* 1995;213:600-607.
 - **Audia JP., Webb CC., Foster JW.** Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *Int J Med Microbiol* 2001;291:97-106.
 - **Bader MW., Navarre WW., Shiao W., Nikaido H., Frye JG., McClelland M., Fang FC., Miller SI.** Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. *Mol Microbiol* 2003;50:219-230.
 - **Bajaj V., Hwang C., Lee CA.** HilA is a novel OmpR/ToxR family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol Microbiol* 1995;18:715-727.
 - **Bajaj V., Lucas RL., Hwang C., Lee CA.** Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by control of *hila* expression. *Mol Microbiol* 1996;22:703-714.
 - **Bakshi CS., Singh VP., Wood MW., Jones PW., Wallis TS., Gallyov EE.** Identification of SopE2, a *Salmonella* secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells. *J Bacteriol* 2000;182:2341-2344.
 - **Bäumler AJ., Tsolis RM., Heffron F.** Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1996;64:1862-1865
 - **Baxter MA, Fahlen TF., Wilson RL., Jones BD.** HilE interacts with HilD and negatively regulates *hila* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect Immun* 2003;71:1295-1305.
 - **Beuzon CR., Meresse S., Unsworth KE., Ruiz-Albert J., Garvis S., Waterman SR., Ryder TA., Boucrot E., Holden DW.** *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *EMBO J* 2000;19:3235-3249.
 - **Bijisma JJE y Groisman EA.** The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 2005;57(1):85-96.
 - **Blocker A., Komoriya K., Aizawa SI.** Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:3027-3030.
-
-

-
-
- **Boddicker JD., Knosp BM., Jones BD.** Transcription of the *Salmonella* invasion gene activator, *hilA*, requires HilD activation in the absence of negative regulators. *J Bacteriol* 2003;185:525-533.
 - **Boddicker JD., Jones BD.** Lon protease activity causes down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells. *Infect Immun* 2004;72:2002-2013.
 - **Bowe F, Lipps CJ., Tsolis RM., Groisman E., Heffron F., Kusters JG.** At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection of mice. *Infect Immun* 1998;66:3372-3377.
 - **Brown NF., Váyanse BA., Coombes BK., Valdez Y., Coburn BA., Finlay BB.** *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS pathogens* 2005;1:252-258.
 - **Brumell JH., Goosney DL., Finlay B. B.** SifA, a type III secreted effector of *Salmonella typhimurium*, directs *Salmonella*-induced filament (Sif) formation along microtubules. *Traffic* 2002;3: 407–415.
 - **Brumell JH., Kujat-Choy S., Brown NF., Vallance BA., Knodler LA., Finlay BB.** SopD2 is a novel type III secreted effector of *Salmonella typhimurium* that targets late endocytic compartments upon delivery into host cells. *Traffic* 2003;4: 36–48
 - **Casadaban, M. J.** Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* 1976;104:541-555.
 - **Catron DM., Silvestre MD., Lange Y., Kadekoppia M., Jones BD., Monack DM.** The *Salmonella*-containing vacuole is a major site of intracellular cholesterol accumulation and recruits the GPI-anchored protein CD55. *Cell Microbiol* 2002;4:315-328.
 - **Chan K., Kim CC., Falkow S.** Microarray-based detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transposon mutants that cannot survive in macrophages and mice. *Infect Immun* 2005;73:5438-5449.
 - **Chakravorty D., Hanse-Wester I., Hensel M.** *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J Exp Med* 2002;195:1155-1166.
 - **Cherepanov PP., Wackernagel W.** Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 1995;158:9-14.
 - **Cirillo DM., Valdivia RH., Monack DM., Falkow S.** Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* 1998;30:175-188.
 - **Coburn B., Li Y., Owen D., Vallance BA., Finlay BB.** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* 2005;73:3219-3227.
 - **Collazo CM., Galán JE.** The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Mol Microbiol* 1997;24:747-756.
 - **Collier-Hyams LS., Zeng H., Sun J., Tomlinson AD., Bao ZQ., Chen H., Madara JL., Orth K., Neish AS.** Cutting edge: *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. *J Immunol* 2002;169:2846-50.
-
-

-
-
- **Cookson BT., Brennan MA.** Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol* 2001;9:113-114.
 - **Coombes BK., Wickham ME., Lowden MJ., Brown NF., Finlay BB.** Negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 is required for contextual control of virulence during typhoid. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:17460-17465.
 - **Criss AK., Casanova JE.** Coordinate regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion of epithelial cells by the Arp2/3 complex and Rho GTPases. *Infect Immun* 2003;71:2885-91.
 - **Darwin KH., Miller VL.** InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1999;181:4949-4954.
 - **Datsenko KA., Wanner BL.** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 Jun 6;97:6640-5.
 - **De Keersmaecker SCJ., Marchal K., Verhoeven TLA., Engelen K., Vanderleyden J., Detweiler CS.** Microarray análisis and motif detection reveal new targets of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulatory protein, including *hilA* itself. *J Bacteriol* 2005;187:4381-4391.
 - **Deiwick J., Nikolaus T., Erdogan S., Hensel M.** Environmental regulation of *Salmonella* Pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbol* 1999;31:1759-1764.
 - **DiRusso CC., Black PN., Weimar JD.** Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. *Prog Lipid Res* 1999;38:129-97.
 - **Dorman CJ., Deighan P.** Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:179-184.
 - **Durant JA., Corrier DE., Ricke SC.** Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of the *hilA* and *invF* genes of *Salmonella typhimurium*. *J Food Prot* 2000;63:573-578.
 - **Eckmann L., Kagnoff MF., Fierer J.** Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 1993;61:4569-4574.
 - **Eichelberg K., Galán JE.** Differential regulation of *Salmonella typhimurium* type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1) encoded transcriptional activators *invF* y *hilA*. *Infect Immun* 1999;67:4099-4105.
 - **Ellermeier CD., Slauch JM.** RtsA and RtsB coordinately regulate expression of the invasion and flagellar genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2003;185:5096-5108.
 - **Ellermeier CD., Slauch JM.** RtsA coordinately regulates DsbA and the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *J Bacteriol* 2004;186:68-79.
 - **Ellermeier CD., Ellermeier JR., Slauch JM.** 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* 2005; 57:691-705.
 - **Eriksson AR., Andersson RA., Pirhonen M y Palva ET.** Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact* 1998;11:743-752.
 - **Eriksson S., Lucchini S., Thompson A., Rhen M., Hinton JCD.** Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 2003;47:103-118.
-
-

-
-
- **Fahlen TF., Wilson RL., Boddicker JD., Jones BD.** Hha is a negative modulator of transcription of *hilA*, the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion gene transcriptional activator. *J Bacteriol* 2001;183:6620-6629.
 - **Feng Y., Wente SR, Majerus PW.** Overexpression of the inositol phosphatase SopB in human 293 cells stimulates cellular chloride influx and inhibits nuclear mRNA export. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:875–879.
 - **Feng X., Oropeza R., Kenney LJ.** Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol.* 2003;48:1131-43.
 - **Feng X., Walthers D., Oropeza R., Kenney LJ.** The response regulator SsrB activates transcription and binds to a region overlapping OmpR binding sites at *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol.* 2004;54:823-35.
 - **Figueroa Ochoa IM., Verdugo-Rodriguez A.** Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Rev Latinoam Microbiol* 2005;47:25-42.
 - **Francis CL., Ryan TA., Jones BD., Smith SJ., Falkow S.** Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* 1993;364:639-642.
 - **Freeman JA., Rappl C., Kuhle V., Hensel M., Miller SI.** SpiC is required for translocation of *Salmonella* pathogenicity island 2 effectors and secretion of translocon proteins SseB and SseC. *J Bacteriol* 2002;184:4971-4980.
 - **Freeman JA., Ohl ME., Miller SI.** The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium translocated effectors SseJ and SifB are targeted to the *Salmonella*-containing vacuole. *Infect Immun* 2003;71: 418–427.
 - **Friebel A., Ilchmann H., Aepfelbacher M., Ehrbar K., Machleidt W., Hardt WD.** SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of Rho GTPases of the host cell. *J Biol Chem* 2001;36:34035-34040.
 - **Frost AJ., Bland AP., Wallis TS.** The early dynamic response of the calf ileal epithelium to *Salmonella typhimurium*. *Vet Pathol* 1997;34:369-386.
 - **Fu Y., Galán JE.** The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* 1998;27:359-368.
 - **Fu Y., Galan J.E.** A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 1999;401:293–297.
 - **Galán JE., Curtis RD.** Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6383-6387.
 - **Galán JE., Curtis RD.** Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling *Infect Immun* 1990;58:1879-1885.
 - **Galyov EE., Wood MW., Rosqvist R., Mullan PB., Watson PR., Hedges S. y Wallis TS.** A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol Microbiol* 1997;25:903-912.
 - **García-del Portillo F.** *Salmonella* intracellular proliferation: where, when and how? *Microbes Infect* 2001;3:1305-1311.
 - **Garcia-Vescovi E., Soncini FC., Groisman EA.** Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* 1996;84:165-174.
 - **Garmendia J., Beuzon CR., Ruiz-Albert J., Holden DW.** The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system. *Microbiology* 2003;149:2385-2396.
-
-

-
-
- **Giannella RA., Gots RE., Charney AN., Greenough SB., Formal SB.** Pathogenesis of *Salmonella*-mediated intestinal fluid secretion. *Gastroenterology* 1975;69:1238-1245.
 - **Ginocchio CC., Olmsted SB., Wells CL., Galán JE.** Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell* 1994;76:717-724.
 - **Goodier RI y Ahmer BMM.** SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol* 2001;2249-2258.
 - **Groisman EA y Ochman H.** Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 1996;87:791-794
 - **Guiney DG., Lesnick M.** Targeting of the actin cytoskeleton during infection by *Salmonella* strains. *Clin Immunol.* 2005 Mar;114:248-55.
 - **Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC.** Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública de México* 2000;42:490-495.
 - **Hacker J., Kaper JB.** Pathogenicity islands and evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:641-679.
 - **Hansen-Wester I., Hensel M.** *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* 2001;3:549-559.
 - **Hardt WD., Galán JE.** A secreted *Salmonella* protein with homology to an avirulence determinant of plant pathogenic bacteria. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:9887-9892.
 - **Hardt WD., Chen LM., Schuebel KE., Bustelo XR., Galán JE.** *Salmonella typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 1998;93:815-826.
 - **Hayward RD., Koronakis V.** Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *EMBO J* 1999;18:4926-4934.
 - **Heeb S, Haas D.** Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact* 2001;14:1351-1363.
 - **Hensel M., Shea JE., Waterman SR., Mundy R., Nikolaus T., Banks G., Vazquez Torres A., Gleeson C., Fang FC., Holden DW.** Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* 1998;30:163-174.
 - **Hensel M., Nikolaus T., Egelseer C.** Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* pathogenicity Island 2. *Mol Microbiol* 1999a;31:489-498.
 - **Hensel M., Hinsley AP., Nikolaus T., Sawers G., Berks BC.** The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 1999b;32:275-287.
 - **Hensel M.** *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* 2000;36:1015-1023.
 - **Hensel M.** Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 2004;294:95-102.
 - **Hersh D., Monack DM., Smith MR., Ghori N., Falkow S., Zychlinsky A.** The *Salmonella* invasion SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:2396-2401.
 - **Hoiseth, S. K., and B. A. Stocker.** Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 1981;291:238-239.
-
-

-
-
- **Ikebe T., Iyoda S., Kutsukake K.** Structure and expression of the *fliA* operon of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* 1999;145:1389-1396.
 - **Iyoda S., Kamidoi T., Hirose K., Kutsukake K., Watanabe H.** A flagellar gene *fliZ* regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog* 2001;30:81-90.
 - **Jepson MA., Clark MA.** Studying M cell and their role in infection. *Trend Microbiol* 1998;6:359-365.
 - **Johnston C., Pegues DA., Hueck CJ., Lee A., Miller SI.** Transcriptional activation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator super family. *Mol Microbiol* 1996;22:715-727.
 - **Jones BD., Lee CA., Falkow S.** Invasion by *Salmonella typhimurium* is affected by the direction of flagellar rotation. *Infect Immun* 1992;60:2475-2480.
 - **Jones BD., Falkow S.** Identification and characterization of a *Salmonella typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. *Infect Immun* 1994;62:3745-3752.
 - **Jones BD., Ghorri N., Falkow S.** *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 1994;180:15-23.
 - **Jones BD., Falkow S.** Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol* 1996;14:533-561.
 - **Jones MA., Wood MW., Mullan PB., Watson PR., Wallis TS., Galyov EE.** Secreted effector proteins of *Salmonella dublin* act in concert to induce enteritis. *Infect Immun* 1998;66:5799-5804.
 - **Jones BD.** *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *J Microbiol* 2005;43:110-117.
 - **Kaniga K., Uralil J., Bliska JB., Galán JE.** A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 1996;21:633-641.
 - **Klein JR., Jones BD.** *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded proteins SseC and SseD are essential for virulence and are substrates of the type III secretion system. *Infect Immun* 2001;69:737-743.
 - **Knodler LA., Vallance BA., Hensel M., Jäckel D., Finlay BB., Steele-Mortimer O.** *Salmonella* type III effectors PipB and PipB2 are targeted to detergent-resistant microdomains on internal host cell membranes. *Mol Microbiol* 2003;49:685-704
 - **Knutton S., Rosenshine I., Pallen MJ., Nisan I., Neves BC., Bain C., Wolff C., Dougan G., Frankel G.** A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* 1998;17:2166-76.
 - **Kuhle V., Hensel M.** SseF and SseG are translocated effectors of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 that modulate aggregation of endosomal compartments. *Cell Microbiol* 2002;4: 813-824
 - **Kuhle V., Hensel M.** Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2812-2826.
 - **Lawhon SD., Maurer R., Suyemoto M., Altier C.** Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol* 2002;46:1451-1464.
 - **Lee CA., Falkow S.** The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:4304-4308.
-
-

-
-
- **Lee CA., Jones BD., Falkow S.** Identification of a *Salmonella typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants Proc Natl Acad Sci 1992;89:1847-1851.
 - **Lee AK., Detweiler CS., Falkow S.** OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. J Bacteriol 2000a;182:771-781.
 - **Lee CA., Silva M., Siber AM., Kelly AJ., Galyov E., McCormick BA.** A secreted *Salmonella* protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration. Proc Natl Acad Sci 2000b;97:12283-12288.
 - **Levine MM., Tacket CO., Sztein MB.** Host-*Salmonella* interaction: human trials. Microbes Infect 2001;3:1271-1279.
 - **Libby SJ., Goebel W., Ludwig A., Buchmeier N., Bowe F., Fang FC., Guiney DG., Songer JG., Heffron F.** A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. Proc Natl Acad Sci 1994;91:489-493.
 - **Linehan SA., Ritkõnen A., Yu XJ., Liu M., Holden DW.** SlyA regulates function of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 (SPI-2) and expression of SPI-2-associated genes. Infect Immun 2005;73:4354-4362.
 - **Lobell RB., Schleif RF.** DNA looping and unlooping by AraC protein. Science 1990;250:528-32.
 - **Loistroh CP., Bajaj V., Lee CA.** The *cis* requirements for transcriptional activation by HilA, a virulence determinant encoded on SPI-1. Mol Microbiol 2000;37:300-315.
 - **Loistroh CP., Lee CA.** The HilA box and sequences outside it determine the magnitude of HilA-dependent activation of P_{prgH} from *Salmonella* pathogenicity island 1. J Bacteriol 2001a;183:4876-48858.
 - **Loistroh CP., Lee CA.** The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. Microbes Infect 2001b;3:1281-1291.
 - **Lucas RL., Loistroh CP., DiRusso CC., Spector MP., Wanner BL., Lee CA.** Multiple factors independently regulate *hila* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J Bacteriol 2000;182:1872-1882.
 - **Lucas RL, Lee CA.** Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in *Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol 2000;36:1024-1033.
 - **Lucas RL, Lee CA.** Roles of *hilC* and *hilD* in regulation of *hila* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J Bacteriol 2001;183:2733-2745.
 - **Lucchini S., Rowley G., Goldberg MD., Hurd D., Harrison M., Hinton JCD.** H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria PLOS Pathogens 2006;2:746-752.
 - **Madrid C., Nieto JM., Juarez A.** Role of the Hha/YmoA family of proteins in the thermoregulation of the expression of virulence factors. Int J Med Microbiol 2002;291:425-432.
 - **Marcus SL., Brumell JH., Pfeifer CG., Finlay BB.** *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes Infect 2000;2:145-156.
 - **Mayer, M. P.** A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. Gene 1995;163:41-46.
 - **McCormick BA., Parkos CA., Colgan SP., Carnes DK., Madara JL.** Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by *Salmonella typhimurium*. J Immunol 1998;160:455-466.
 - **Méresse S., Unsworth KE., Habermann A., Griffiths G., Fang F., Martinez-Lorenzo MJ et al.** Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar *Salmonella*. Cell Microbiol 2001;3:567-577.
-
-

-
-
- **Miao E. A., Scherer C. A., Tsolis R. M., Kingsley R. A., Adams L. G., Bäumler A. J. et al.** *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol Microbiol* 1999;34:850–864.
 - **Miao E. A., Brittnacher M., Haraga A., Jeng R. L., Welch M. D. and Miller S. I.** *Salmonella* effectors translocated across the vacuolar membrane interact with the actin cytoskeleton. *Mol. Microbiol* 2003;48: 401–415.
 - **Miold S.** *Salmonella* host cell invasion emerged by acquisition of a mosaic of separate genetic elements, including *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5 and *sopE2*. *J Bacteriol* 2001;183:2348-2358.
 - **Navarre WW., Porwollik S., Wang Y., McClelland M., Rosen H., Libby SJ., Fang FC.** Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* 2006;313: 236-238
 - **Norris FA., Wilson MP, Wallis TS, Galyov EE, Majerus PW.** SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:14057–14059.
 - **Norte VA., Stapleton MR., Green J.** PhoP-responsive expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *slyA* gene. *J Bacteriol* 2003;185:3508-3514.
 - **Ochman H., Groisman EA.** Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. *Infect Immun* 1996;64:5410-5412.
 - **Ochman H., Soncini FC., Solomon F., Groisman EA.** Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:7800-7804.
 - **Olekhovich IN., Kadner RJ.** DNA-binding activities of the HilC and HilD virulence regulatory proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2002;184:4148-4160.
 - **Olekhovich IN., Kadner RJ.** Contribution of the RpoA C-terminal domain to stimulation of the *Salmonella enterica hilA* promoter by HilC y HilD. *J Bacteriol* 2004;186:3249-3253.
 - **Olekhovich IN., Kadner RJ.** Crucial Roles of Both Flanking Sequences in Silencing of the *hilA* promoter in *Salmonella enterica*. *J Mol Biol* 2006;357:373-386.
 - **Oshini K., Kutsukake K., Suzuki H., Iino T.** Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* 1990;221:139-147.
 - **Pallen MJ., Beatson SA., Bailey CM.** Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type III secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiol Lett* 2005;29:201-229.
 - **Pang T, Bhutta ZA, Finlay BB, Altwegg M.** Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol* 1995;3:253-255.
 - **Pinson V., Takahashi M., Rouviere-Yaniv J.** Differential binding of the *Escherichia coli* HU homodimeric forms and heterodimeric form to linear, gapped, and criciform DNA. *J Mol Biol* 1999;287:485-497.
 - **Prouty AM., Gunn JS.** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infect Immun* 2000;68:6763-6769.
 - **Rakeman JL., Heather RB., Miller SI.** A HilA-independent pathway to *Salmonella typhimurium* invasion gene transcription. *J Bacteriol* 1999;181:3096-3104.
 - **Russell DA., Dooley JS., Haylock RW.** The steady-state *orgA* specific mRNA levels in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are repressed by oxygen during
-
-

-
-
- logarithmic growth phase but not early-stationary phase. FEMS Microbiol Lett 2004;236:65-72.
- **Salcedo SP., Holden DW.** SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network. EMBO J 2003;22:5003-5014.
 - **Santos RL., Zhang S., Tsois RM., Kingsley RA., Adams LG., Baumler AJ.** Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. Microbes Infect 2001;3:1335-1344.
 - **Santos RL., Tsois RM., Baumler AJ., Adams LG.** Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. Braz J med Biol res 2003;36:3-12.
 - **Schechter LM., Damrauer SM., Lee CA.** Two AraC/XylS family members can independently counteract the effect of repressing sequences upstream of the *hilA* promoter. Mol Microbiol 1999;32:629-642.
 - **Schechter LM., Lee CA.** AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella typhimurium hilA* promoter. Mol Microbiol 2001;40:189-1299.
 - **Schechter LM., Jain S., Akbar S., Lee CA.** The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU, and Fis affect *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Infect Immun 2003;71:5432-5435.
 - **Schiemann DA.** Association with MDCK epithelial cells by *Salmonella typhimurium* is reduced during utilization of carbohydrates. Infect Immun 1995;63:1462-1467.
 - **Schwan WR., Huang XZ., Hu L., Kopecko DJ.** Differential bacterial survival, replication, and apoptosis-inducing ability of *Salmonella* serovars within human and murine macrophages. Infect Immun 2000;68:1005-1013.
 - **Shea JE., Hensel M., Gleeson C., Holden DW.** Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:2593-2597.
 - **Shi, Y., Latifi T., Cromie MJ., Groisman EA.** Transcriptional control of the antimicrobial peptide resistance *ugtL* gene by the *Salmonella* PhoP and SlyA regulatory proteins. J Biol Chem 2004;279:38618-38625.
 - **Silphaduang U., Mascarenhas M., Karmali M., Coombes BK.** Repression of Intracellular Virulence Factors in *Salmonella* by the Hha and YdgT Nucleoid-Associated Proteins. J Bacteriol 2007;189:3669-3673.
 - **Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica.** 2007.
 - **Stender S., Friebel A., Linder S., Rohde M., Miroid S., Hardt WD.** Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. Mol Microbiol 2000;36:1206-1211.
 - **Takaya A., Suzuki M., Matsui H., Tomoyasu T., Sashinami H., Nakane A., Yamamoto T.** Lon, a stress-induced ATP-dependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of mice. Infect Immun 2003;71:690-696.
 - **Teplitski M., Goodier RI., Ahmer BMM.** Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. J Bacteriol 2003;185:7257-7265.
 - **Thanassi DG., Hultgren SJ.** Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. Curr Opin Cell Biol 2000;12:420-430.
 - **Tsois R. M., Townsend SM., Miao EA., Miller SI., Ficht TA., Adams LG. et al.** Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype typhimurium host range
-
-

factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* 1999;67: 6385–6393.

- **Uchiya K., Barbieri M., Funato K., Shah A., Stahl P., Groisman EA.** A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J* 1999;18:3294-3933.
 - **Uzzau S., Figueroa-Bossi N., Rubino S., Bossi L.** Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:26:15264-15269.
 - **Valdivia RH., Falkow S.** Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* 1997;277:2007-2011.
 - **Vázquez-Torres A., Jones-Carson J., Bäumlér AJ., Falkow S., Valdivia R., Brown W., Le M., Berggren R., Parks WT., Fang FC.** Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* 1999;401:804-808.
 - **Vázquez-Torres A., Xu Y., Jones-Carson J., Holden DW., Lucia SM., Dinauer MC., Mastroeni P., Fang FC.** *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NAPH oxidase. *Science* 2000;287:1655-1658.
 - **Vázquez-Torres A., Fang FC.** *Salmonella* evasion of the NADPH phagocyte oxidase. *Microbes Infect* 2001;3:1313-1320.
 - **Waterman SR., Holden DW.** Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* 2003;5:501-11.
 - **Wilson RL., Libby SJ., Freet AM., Boddicker JD., Fahlen TF., Jones BD.** Fis, a DNA nucleoid-associated protein, is involved in *Salmonella typhimurium* SPI-1 invasion gene expression. *Mol Microbiol* 2001;39:79-88.
 - **Wong SM., Carroll PA., Rahme LG., Ausubel FM., Calderwood SB.** Modulation of expression of the ToxR regulon in *Vibrio cholerae* by a member of the two-component family of response regulators. *Infect Immun* 1998;66:5854-5861.
 - **Wood MW, Jones MA, Watson PR, Hedges S, Walis TS, Galyov EE.** Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol Microbiol* 1998;29:883-891.
 - **Wood MW, Jones MA., Siber AM., McCormick BASH., Rosqvist R., Wallis TS., Galyov EE.** The secreted effector protein of *Salmonella dublin*, SopA, is translocated into eukaryotic cells and influences the induction of enteritis. *Cell Microbiol* 2000;2:293-303.
 - **World Health Organization 2005.**
 - **Yang H., Liu MY., Romeo T.** Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the CsrA gene product. *J Bacteriol* 1996;178:1012-7.
 - **Zhang S., Santos RL., Tsolis RM., Stender S., Hardt WD., Bäumlér AJ., Adams LG.** The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect Immun* 2002;70:3843-3855.
 - **Zhou D., Mooseker MS., Galám JE.** Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* 1999a;283:2092-2095.
 - **Zhou D., Mooseker MS., Galám JE.** An invasion-associated *Salmonella* protein modulates the actin-bundling activity of plastin. *Proc Natl Acad Sci* 1999b;96:10176-10181.
 - **Zhou D., Chen LLH., Shears BS., Galán JE.** A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host-
-
-

cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. *Mol Microbiol* 2001;39:248-59.

- **Zhou D., Galán J.** *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect* 2001;3:1293-1298.

