



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Estudio de la regulación por fase de crecimiento de  
los genes de las islas de patogenicidad 1 (SPI-1) y 2  
(SPI-2) de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**Paola Sofía Kuri Rodríguez**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**M. en C. Luary Carolina Martínez Chavarría**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno  
Kuri  
Rodríguez  
Paola Sofía  
7222711667  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
407021659
2. Datos del tutor  
M. en C.  
Luay Carolina  
Martínez  
Chavarría
3. Datos del sinodal 1  
Doctor  
José Luis  
Puente  
García
4. Datos del sinodal 2  
Doctor  
Luis  
Servín  
González
5. Datos del sinodal 3  
M. en IBB.  
Claudia Andrea  
Segal  
Kischinevzky
6. Datos del sinodal 4  
Doctor  
Ricardo  
Oropeza  
Navarro
7. Datos del trabajo escrito  
Estudio de la regulación por fase de crecimiento de los genes de las islas de patogenicidad 1 (SPI-1) y 2 (SPI-2) de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium  
93 p.  
2010

## *Dedicatoria*

*A mis padres, a quienes debo todas las oportunidades que he tenido en mi vida y las enseñanzas que me han permitido aprovecharlas. Cualquier logro mío es sólo un reflejo de su amor y apoyo incondicional, que siempre me han sido y serán indispensables.*

*A mi hermana, cuya compañía me ha alegrado siempre.*

## Agradecimientos

Antes que a nadie, a la M. en C. Luary Martínez Chavarría, quien con paciencia, esfuerzo y dedicación me llevó desde los primeros pasos en el laboratorio hasta la culminación de este trabajo. Luary, además del trabajo académico, te agradezco sinceramente la amistad que me brindaste.

Al Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán, por los ánimos, las enseñanzas y la amistad., eres un ejemplo a seguir. Estoy súmamente agradecida por todo el tiempo que me dedicaron tú y Luary, y me considero muy afortunada por haber tenido la oportunidad de trabajar con ustedes.

Al Dr. José Luis Puente García, por abrirme las puertas del Instituto de Biotecnología y recibirme en su laboratorio, lo que para mí fue una oportunidad única. Gracias también por estar siempre disponible para dar palabras de aliento y ayudar a resolver problemas.

A mis compañeros del laboratorio, que me hicieron sentir bienvenida y nunca me negaron ayuda.

Especialmente a Elvira Villa, por su impecable apoyo técnico, indispensable para la realización de este trabajo.

A mis sinodales: La Maestra Claudia Segal y los Dres. Luis Servín, Ricardo Oropeza y José Luis Puente. Gracias por su disponibilidad y por los comentarios que ayudaron a mejorar este trabajo.

A la Facultad de Ciencias de la UNAM, por poner a mi disposición los recursos que hoy me permiten lograr profesionalmente y mañana me ayudarán alcanzar más metas.

Por último, a mis amigos de la Facultad. De las cosas que más agradezco en la carrera fue haberlos tenido cerca a ustedes. Nunca olvidaré todo lo que disfrutamos, aprendimos y vivimos juntos en estos cuatro años. Y todavía nos falta mucho...

# Índice

I. Resumen .....	7
II. Introducción .....	9
El género <i>Salmonella</i> : clasificación e importancia .....	9
Mecanismo de infección.....	10
Modelos animales para el estudio de la infección por <i>Salmonella</i> .....	13
Islas de patogenicidad en <i>Salmonella</i> .....	14
Sistemas de secreción tipo tres (SSTT).....	17
SPI-1 .....	18
SPI-2.....	22
Regulación de la expresión génica de las islas de patogenicidad.....	27
Regulación genética de SPI-1.....	28
Regulación genética de SPI-2.....	31
Estímulos ambientales que inducen la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 ..	32
III. Antecedentes.....	35
IV. Objetivos .....	40
Objetivo general .....	40
Objetivo particular.....	40
Objetivos específicos.....	40
V. Metodología.....	41
Preparación de células electrocompetentes .....	44
Electroporación .....	45
Cultivos bacterianos para cuantificar la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 .....	45
Cuantificación de la actividad enzimática específica de CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa).....	47
Western blot para detectar proteínas etiquetadas con el epítoto FLAG .....	48
Construcción del plásmido que contiene la fusión transcripcional <i>barA-cat</i> .....	49

Precipitación de ligaciones .....	50
Purificación de plásmidos .....	50
Purificación de RNA total para ensayos de RT-PCR en tiempo real .....	51
Cuantificación de RNA total .....	52
Ensayos de RT-PCR .....	52
VI. Resultados .....	54
Los genes que conforman la cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 presentan un patrón similar de regulación por fase de crecimiento .....	54
La sobre-expresión de SirA, el regulador que se encuentra al inicio de la cascada reguladora de SPI-1, no altera el patrón de expresión dependiente de fase de crecimiento de los genes que se encuentran por debajo en la cascada .....	58
HilE, Lon y H-NS no reprimen la expresión de los genes de SPI-1 en la fase de crecimiento exponencial .....	60
La inducción de la expresión de los genes de SPI-1 en la fase estacionaria temprana parece ser controlada por la respuesta a la escasez de nutrientes mediada por ppGpp .....	61
El desfase en la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 podría deberse a un mecanismo de regulación postranscripcional sobre el operón <i>ssrAB</i> .....	63
La sobre-expresión de SsrB adelanta la expresión de los genes de SPI-2 a la fase de crecimiento exponencial .....	67
SsrB reprime la expresión de SPI-1 .....	69
SsrB se autorregula positivamente en medio mínimo pero el efecto no es claro en LB .....	70
VII. Discusión y conclusiones .....	74
VIII. Perspectivas .....	85
IX. Apéndice .....	86
Medios de cultivo empleados .....	86
Reactivos utilizados para Western blot .....	87
X. Referencias .....	88

## I. Resumen

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) es una bacteria patógena para humanos y animales, que puede producir una infección intestinal localizada, la cual genera diarrea, o una infección sistémica. La mayoría de sus genes de virulencia se encuentran en regiones específicas de su genoma, denominadas SPIs (*Salmonella Pathogenicity Islands*), siendo las más estudiadas SPI-1 y SPI-2. SPI-1 contiene genes necesarios para que *Salmonella* pueda invadir las células del epitelio intestinal del hospedador, mientras que SPI-2 contiene genes requeridos para su sobrevivencia y replicación intracelular. La expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 está altamente regulada. HilA, codificado en SPI-1, induce la expresión de los genes de esta isla, mientras que los genes de SPI-2 son regulados por SsrA/B, un sistema de dos componentes, también codificado en SPI-2. La expresión de HilA y SsrA/B está controlada, a su vez, por una cascada reguladora que involucra al sistema de dos componentes BarA/SirA y a dos RNAs no traducidos, CsrB y CsrC, codificados fuera de las SPIs, que controlan positivamente la expresión del regulador HilD, codificado en SPI-1. HilD induce directamente la expresión de HilA (SPI-1) y SsrA/B (SPI-2) en diferentes etapas del crecimiento de *Salmonella* en el medio de cultivo Luria-Bertani (LB), con lo que establece una comunicación a nivel transcripcional entre SPI-1 y SPI-2. Los genes de SPI-1 se expresan en la fase temprana de crecimiento estacionario, mientras que los genes de SPI-2 lo hacen en la fase estacionaria tardía, donde la expresión de los genes de SPI-1 es reprimida.

Para investigar más acerca de los mecanismos moleculares que regulan esta expresión diferencial de los genes de SPI-1 y SPI-2, en este trabajo analizamos la expresión de los genes que conforman la cascada de regulación de SPI-1 y SPI-2, en diferentes fases del crecimiento de *S. Typhimurium* en LB, así como en diferentes fondos genéticos de esta bacteria, mediante fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, RT-PCR en tiempo real y ensayos de Western blot.

Nuestros resultados mostraron que la expresión de los genes *sirA*, *barA*, *csrB*, *csrC*, *hilD*, *hilA* e *invF* se induce en la fase temprana de crecimiento estacionario en LB. Sin embargo, la inducción de los genes de SPI-1 (*hilD*, *hilA* e *invF*) en esta etapa del crecimiento parece estar mediada principalmente por la respuesta a la escasez de nutrientes, controlada por la molécula ppGpp y no se debe a un efecto en cascada de la regulación por fase de



crecimiento de los genes *sirA*, *barA*, *csrB* y *csrC*. Además, nuestros resultados mostraron que la sobre-expresión de SsrB reprime la expresión de los genes de SPI-1, lo que sugiere que este regulador tiene una función dual, por un lado la de inducir la expresión de los genes de SPI-2 y por otro la de reprimir la de los genes de SPI-1 en la fase del crecimiento estacionaria tardía en LB. Asimismo, nuestros resultados mostraron que el operón *ssrAB* presenta un patrón de transcripción similar al de los genes de SPI-1, mientras que la expresión de las proteínas SsrA y SsrB tiene un patrón de expresión más parecido al de los genes de SPI-2, lo cual sugiere la existencia de un mecanismo de regulación postranscripcional para *ssrAB*, que podría determinar el desfase en la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 en LB. Por otro lado, resultados obtenidos en este estudio mostraron que SsrB se autorregula positivamente cuando *S. Typhimurium* crece en el medio mínimo N, pero no cuando crece en LB. Esto, junto con otros resultados obtenidos en nuestro grupo, sugiere que HilD y SsrB podrían tener una función similar, la de contrarrestar la represión mediada por H-NS sobre *ssrAB*, pero actuando cada uno en una distinta condición de crecimiento, HilD en LB y SsrB en medio mínimo.

Nuestros resultados contribuyen de manera importante al entendimiento de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de los genes de virulencia en *Salmonella enterica*.

## II. Introducción

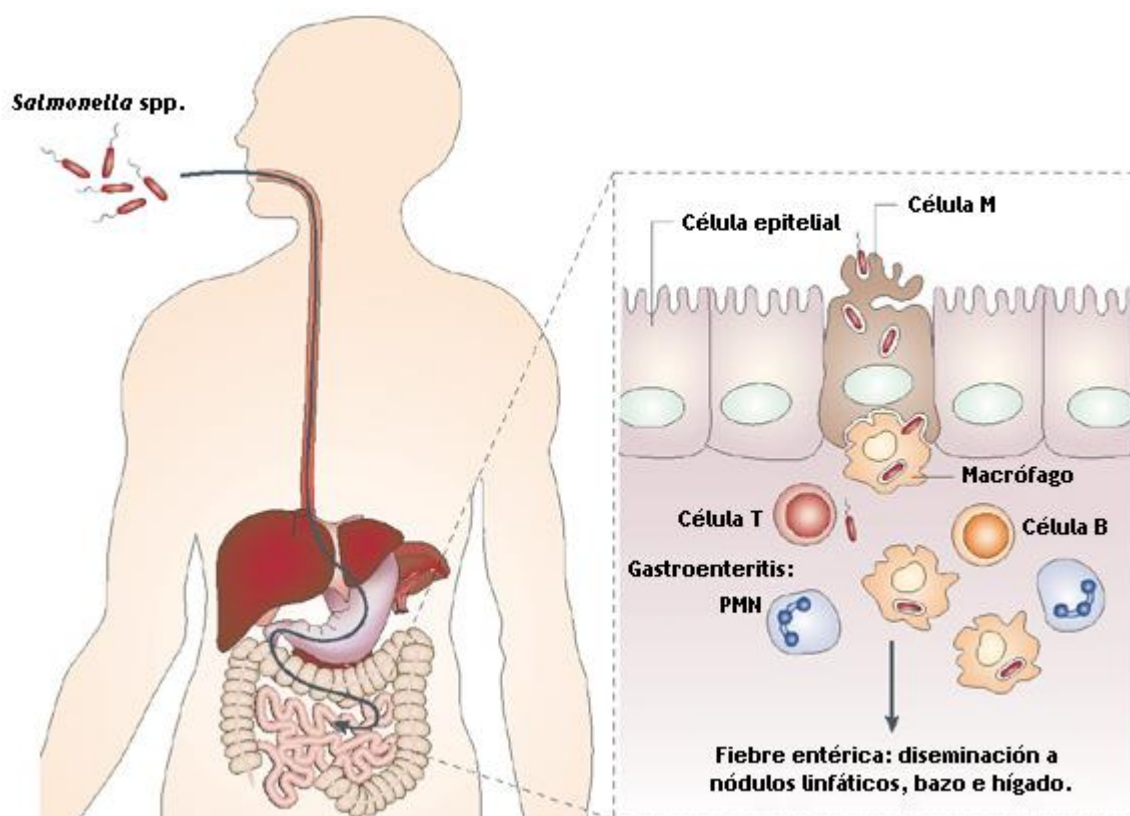
### El género *Salmonella*: clasificación e importancia

Las bacterias del género *Salmonella* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, la cual agrupa a bacterias Gram-negativas que son anaerobias facultativas. Muchos de los miembros de esta familia son parte de la microbiota normal de los intestinos de vertebrados (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009). El género *Salmonella* comprende tres especies: *S. subterranea*, *S. bongori* y *S. enterica* (Su & Chiu, 2007). Esta última se divide en 6 subespecies (Coburn *et al.*, 2007): *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* y *S. enterica* subsp. *indica* (Su & Chiu, 2007). A su vez, cada subespecie se ha dividido tradicionalmente en serovares, con base en diferencias en estructuras flagelares, carbohidratos y lipopolisacáridos (Chan *et al.*, 2003). Más del 60% de los 2,541 serovares identificados hasta ahora pertenecen a la subespecie *enterica* (Coburn *et al.*, 2007), en la cual se encuentra el 99% de los serovares responsables de causar enfermedades en animales de sangre caliente (Chan *et al.*, 2003). Un aspecto importante sobre estos serovares es que tienen la capacidad de provocar enfermedades de severidad variable en un amplio rango de hospederos (Chan *et al.*, 2003), razón por la cual una de las líneas de investigación predominantes en *Salmonella* tiene como finalidad la identificación de los factores genéticos que le confieren la capacidad de colonizar o causar enfermedades sistémicas en distintos hospederos (Chan *et al.*, 2003). Los serovares más estudiados son Choleraesuis, Enteritidis, Paratyphi, Typhi y Typhimurium (Su & Chiu, 2007).

Las infecciones intestinales causadas por *Salmonella* constituyen un problema de salud pública considerable, pues a pesar de que el índice de mortalidad sólo es significativo en países en vías de desarrollo, en los países desarrollados sigue teniendo un impacto socio-económico importante (Hansen-Wester & Hensel, 2001). Anualmente se presentan entre 200 y 1,300 millones de casos de salmonelosis a nivel mundial, que ocasionan alrededor de 3 millones de muertes (Coburn *et al.*, 2007). En nuestro país, durante el 2009 se registró un total de 136,222 casos de salmonelosis no tifoidea y 46,389 de fiebre tifoidea. En lo que va de este año (hasta junio 12), se habían presentado 46,389 casos de salmonelosis no tifoidea y 19,497 de fiebre tifoidea (SUIVE, 2010).

## Mecanismo de infección

*Salmonella* ingresa al organismo generalmente por la vía oral, a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados (frecuentemente de origen animal), aunque se ha reportado que el contacto con reptiles o anfibios, frecuentes portadores de la bacteria, también puede ser una fuente de contagio (Haraga *et al.*, 2008). La bacteria posee una respuesta adaptativa de tolerancia a la acidez que le permite contender con el pH ácido del estómago (García-del Portillo *et al.*, 1993) y así llegar posteriormente a los intestinos delgado y grueso, donde coloniza el íleon y el ciego, respectivamente, probablemente al superar a la microflora residente (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009).



**Figura 1.** *Salmonella* ingresa al organismo por la vía oral y es capaz de sobrevivir al pH ácido del estómago y evadir las múltiples defensas del intestino delgado para obtener acceso al epitelio intestinal. La bacteria puede mediar su propia internalización en los enterocitos o ser internalizada por células M, donde permanece dentro de una vacuola hasta llegar a células del sistema linfático. A partir de este punto, aquellos serovares a los que se les asocia con una enfermedad sistémica, ingresan a los macrófagos y son diseminados a través del sistema retículoendotelial a diversos órganos del cuerpo. Por otro lado, los serovares que se limitan a colonizar el intestino, inducen una respuesta inflamatoria local caracterizada por la trans migración de leucocitos polimorfonucleares hacia el lumen intestinal y la producción de diarrea. Modificado de Haraga *et al.*, 2008.

En el intestino, *Salmonella* evita ser destruida por enzimas digestivas, sales biliares, IgA secretoria, péptidos antimicrobianos y otras defensas inmunológicas innatas del hospedero (Haraga *et al.*, 2008) (Figura 1). Esto le permite llegar al epitelio intestinal para invadirlo, paso crucial para la progresión tanto de la colonización del hospedero como de la enfermedad sistémica (Hansen-Wester & Hensel, 2001). La internalización de la bacteria puede ocurrir de varias maneras (Haraga *et al.*, 2008). Se ha reportado que ésta puede estar mediada tanto por fagocitos profesionales como los macrófagos, que reconocen eficientemente patógenos bacterianos y los internalizan, pero también que puede llevarse a cabo por fagocitos que expresan moléculas CD18 (Vazquez-Torres *et al.*, 1999). Asimismo, *Salmonella* puede mediar su propia endocitosis y de esta manera invadir activamente células fagocíticas o no fagocíticas, como células M o enterocitos, respectivamente (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009). Para esto, la bacteria inicialmente se adhiere a la superficie apical de la célula en un proceso que involucra diferentes tipos de fimbrias, de las cuales cuatro han sido caracterizadas genéticamente: Fim (fimbrias de tipo I), PE (fimbrias codificadas en plásmidos), LP (fimbrias polares largas) y curli (fimbrias delgadas que se agregan) (Darwin & Miller, 1999). Las fimbrias también se pueden relacionar con adhesinas específicas, que reconocerían ciertos factores en las células eucariontes. Algunos estudios sugieren que cada tipo de fimbria tiene un tropismo específico por cierto tipo celular o para células de una especie en particular, lo que podría determinar la especificidad de hospedero (Bäumler *et al.*, 1996, Darwin & Miller, 1999).

Después de la adherencia al epitelio intestinal, *Salmonella* emplea un sistema de secreción tipo tres (SSTT) para translocar hacia las células del hospedador, diversas proteínas que modulan el citoesqueleto e inducen la formación de prolongaciones membranales que rodean a la bacteria. La internalización de la bacteria se completa con el alineamiento de las prolongaciones de la membrana plasmática para encerrarla en un fagosoma sellado (Ly & Casanova, 2007). Dependiendo del hospedero, *Salmonella* puede invadir a las células M, células especializadas que internalizan materiales a través de pinocitosis y que carecen del borde de cepillo en su superficie, lo que facilita la adherencia de la bacteria (Haraga *et al.*, 2008).

Una vez que *Salmonella* se encuentra dentro de la célula del hospedero, permanece en la vacuola que se formó con su internalización, llamada SCV por sus siglas en inglés

(*Salmonella* Containing Vacuole). En un modelo simplificado de la biogénesis de la SCV en una célula, ésta puede dividirse en tres etapas: temprana, intermedia y tardía. La SCV temprana se caracteriza por la presencia de marcadores de vías endocíticas tempranas. Posteriormente, en la etapa intermedia, se da un arribo secuencial de proteínas de membrana endolisosomales (vATPasas y proteínas asociadas a membranas lisosomales, Lamps), disminuye el pH del lumen a menos de 4.5 y la SCV se coloca en una posición perinuclear, cerca del centro organizador de microtúbulos (MTOC, por sus siglas en inglés) (Steele-Mortimer, 2008). Mantener a la SCV cerca de la región perinuclear parece ser importante para promover la replicación bacteriana, pues la cercanía al aparato de Golgi podría facilitar la intercepción de vesículas para obtener nutrientes y/o membrana (McGhie *et al.*, 2009). En la etapa tardía inicia la replicación bacteriana y se da un crecimiento centrifugal, dentro de la SCV perinuclear, de extensiones membranosas tubulares llamadas Sifs (Filamentos inducidos por *Salmonella*). También en esta etapa se da una notable acumulación de actina y de microtúbulos alrededor de la SCV (Steele-Mortimer, 2008).

Durante la biogénesis de la SCV, *Salmonella* es capaz de lidiar con los cambios ambientales que ocurren dentro de ésta, como la disminución rápida de pH y la privación de nutrientes, que normalmente restringen el crecimiento de bacterias que han sido fagocitadas (Hansen-Wester & Hensel, 2001). Por lo tanto, una de las características esenciales para la virulencia de *Salmonella* es la de ser un patógeno intracelular facultativo, ya que tiene la capacidad de sobrevivir y replicarse en el interior de células fagocíticas y no fagocíticas. Esto lo logra mediante la translocación, a través de un segundo SSTT, de proteínas efectoras entre cuyas funciones se encuentra el mantener la estabilidad de las SCVs y evitar la fusión de éstas con los lisosomas para impedir el contacto con metabolitos tóxicos para la bacteria.

Dentro de las células fagocíticas, *Salmonella* tiene acceso al sistema circulatorio del hospedero, con lo que se da la infección extraintestinal y la diseminación por el organismo para residir predominantemente en macrófagos, leucocitos polimorfonucleares (PMN) y otros fagocitos no profesionales de órganos como el hígado, el bazo, entre otros, en los que continúa replicándose (Coburn *et al.*, 2007).

## **Modelos animales para el estudio de la infección por *Salmonella***

Como se mencionó anteriormente, algunos serovares de *Salmonella* pueden infectar una gran variedad de hospederos. Esto ha permitido el desarrollo de modelos de infección en animales, mismos que representan una herramienta muy útil para estudiar los diferentes cuadros clínicos que *Salmonella* provoca en el humano (Santos *et al.*, 2001).

*S. enterica* ser. Typhimurium (*S. Typhimurium*) es uno de los serotipos que más se ha empleado como modelo de estudio, generando gran parte del conocimiento que actualmente se tiene sobre la salmonelosis. En el humano, *S. Typhimurium* causa una enteritis localizada, pero en el ratón provoca una enfermedad sistémica (Hansen-Wester & Hensel, 2001) semejante a la fiebre tifoidea humana, causada por *S. enterica* ser. Typhi (*S. Typhi*). Incluso se ha reportado que la distribución de la bacteria en el tejido de ratones infectados con *S. Typhimurium* es similar a aquélla que presentan pacientes con fiebre tifoidea. Debido a esto, la infección por *S. Typhimurium* en ratones ha sido empleada como modelo para estudiar la infección por *S. Typhi* en humanos. Dada la frecuente asociación de *S. Typhimurium* con roedores, se propone que es un patógeno natural de estos animales (Santos *et al.*, 2001).

Por mucho tiempo se ha reconocido que *Salmonella* tiene una capacidad de colonización intestinal muy baja en el ratón, lo que se ha denominado “resistencia a la colonización”. Ésta se asocia fuertemente a la presencia de la microflora comensal, aunque los mecanismos moleculares de resistencia descritos son controversiales (Hapfelmeier & Hardt, 2005). Gracias a esta “resistencia a la colonización”, los ratones no desarrollan enfermedad localizada y por tanto no presentan diarrea, razón por la cual el modelo murino no ha sido apropiado para el estudio de la patogénesis de la enteritis que se presenta en el humano. Sin embargo, la infección experimental o natural de los bovinos con *S. Typhimurium* o *S. enterica* ser. Dublin (*S. Dublin*) resulta en una enfermedad entérica con características clínicas y patológicas que se asemejan a la enfermedad entérica que se presenta en los humanos, misma que ha sido estudiada empleando como modelo la infección en asas ligadas del íleon en los bovinos (Santos *et al.*, 2001). Desafortunadamente, los métodos para alterar inmunológica y genéticamente al bovino son muy limitados en comparación con el modelo murino, hecho que ha complicado el estudio

de los mecanismos moleculares de la enfermedad usando ese modelo animal (Hapfelmeier & Hardt, 2005).

Debido a estas limitaciones, recientemente se desarrolló un modelo murino para el estudio de la enteropatogénesis, el cual consiste en emplear ratones que son previamente tratados con estreptomicina (Barthel *et al.*, 2003). El tratamiento con este antibiótico altera la microflora presente en el intestino del ratón, generando cambios en el ambiente intestinal y reduciendo la resistencia a la colonización. El ratón se vuelve susceptible a la infección por *S. Typhimurium*, lo que le provoca una colitis parecida a la respuesta inflamatoria observada en el colon humano. La principal ventaja de este modelo es la existencia de múltiples herramientas metodológicas que se han desarrollado para el ratón y que han sido ampliamente utilizadas hasta la fecha (Barthel *et al.*, 2003).

### **Islas de patogenicidad en *Salmonella***

La mayoría de los factores de virulencia de *S. Typhimurium* están codificados en su cromosoma y muchos de éstos se encuentran en regiones denominadas islas de patogenicidad (Marcus *et al.*, 2000). En general, las PAIs (Pathogenicity Islands) son regiones relativamente grandes de DNA cromosomal (de 10 a 200 kb) que están presentes en los genomas de bacterias patógenas, pero ausentes en bacterias no patógenas de la misma familia (Schmidt & Hensel, 2004). En el caso de muchas bacterias entéricas, la adquisición de una sola isla de patogenicidad basta para que un organismo normalmente inocuo se convierta en un patógeno (Marcus *et al.*, 2000).

Las PAIs se encuentran frecuentemente insertadas en sitios específicos del genoma, aledaños a genes que codifican un RNA de transferencia (tRNA). La presencia en estas islas de genes funcionales o crípticos que codifican elementos móviles tales como secuencias de inserción, integrasas y transposasas, fagos, plásmidos o transposones, así como de diferentes secuencias repetidas que las flanquean, sugiere que son genéticamente inestables y que pueden adquirirse mediante múltiples eventos de transferencia horizontal. Su contenido de G+C es distinto al del resto del genoma que las tiene, por lo que se considera que conservan el contenido de G+C de la especie donadora, generalmente más bajo que el del cromosoma receptor (Schmidt & Hensel, 2004).

En 1989, Galán y Curtiss identificaron genes necesarios exclusivamente para la invasión de células eucariontes mientras estudiaban mutantes de *S. Typhimurium* que fueran deficientes en la penetración a la célula del hospedero, pero que aún pudieran adherirse a ésta (Galán & Curtiss, 1989). Mediante estudios posteriores se encontró que dichos genes, junto con otros requeridos para la invasión, se encontraban agrupados en una región específica del cromosoma de *Salmonella* que estaba ausente en *Escherichia coli* K12 (Hansen-Wester & Hensel, 2001). A dicha agrupación de genes se le designó Isla de Patogenicidad de *Salmonella* 1 (SPI-1, por sus siglas en inglés *Salmonella Pathogenicity Island*) (Schmidt & Hensel, 2004). Posteriormente, en 1996 Ochman y colaboradores, mediante el estudio de mutantes que eran incapaces de sobrevivir dentro de los macrófagos, pero que no estaban afectadas en su capacidad para invadir a la célula, identificaron otro grupo de genes requeridos para la supervivencia y replicación intracelular de la bacteria, agrupación a la que se le llamó SPI-2 (Hansen-Wester & Hensel, 2001, Ochman *et al.*, 1996). Así, las SPIs se definieron como grandes casetes genéticos localizados en el cromosoma de *Salmonella*, que codifican elementos determinantes para el establecimiento de relaciones específicas con el hospedero y que son requeridos para la virulencia bacteriana en un cierto modelo animal (Marcus *et al.*, 2000).

En *Salmonella* se han identificado 12 islas de patogenicidad diferentes, algunas conservadas y otras específicas para ciertos serovares (Tabla 1). Existen además, regiones cromosómicas llamadas SPI que poseen características de PAI pero cuya función en la patogénesis de la bacteria no es clara (Hensel, 2004). SPI-1 y SPI-2 son hasta hoy las más estudiadas y mejor caracterizadas. Ambas islas codifican para proteínas que conforman un sistema de secreción tipo tres (SSTT) y tienen un papel predominante en diferentes etapas de la infección por *Salmonella*. Los genes de SPI-1 codifican para proteínas necesarias para la invasión de células no fagocíticas, la inducción de las respuestas intestinales inflamatorias y la producción de diarrea. Los genes de SPI-2 son importantes durante la fase intracelular, pues codifican proteínas necesarias para sobrevivir dentro de los macrófagos y establecer una infección sistémica (Haraga *et al.*, 2008). Las islas de patogenicidad descritas hasta ahora en *S. enterica* se describen en la Tabla 1. Las características y funciones de SPI-1 y SPI-2 se describen con mayor detalle posteriormente.



**Tabla 1.** Islas de patogenicidad de *Salmonella*

Nombre	Tamaño (kb)	Contenido G+C (%)	Punto de inserción	Descripción
SPI-1	39.8	47%	Localizado en el centisoma 63, no asociada a un gen de tRNA	Contiene genes para un SSTT y proteínas efectoras para el proceso de invasión a células epiteliales.
SPI-2	39.7	Primer segmento 54% (15 kb)  Segundo segmento 43% (25 kb)	<i>valV</i> tRNA	Contiene genes <i>ttr</i> (tetrionato reductasa) para respiración en condiciones de anaerobiosis.  Contiene genes para un SSTT y proteínas efectoras para la supervivencia intracelular.
SPI-3	17.3	39.8-49.3	<i>selC</i> tRNA	Estructura mosaico, codifica para el sistema de transporte de magnesio de alta afinidad MgtCB, importante en la fase intracelular de la infección.
SPI-4	23.4	44.8	Gen similar a tRNA, <i>ssb</i>	Posee un SST1, que podría secretar proteínas que contribuyan a la colonización
SPI-5	7.6	43.6	<i>serT</i> tRNA	Estructura mosaico, contiene efectores translocados por el SSTT de SPI-1 (SopB) y SPI-2 (PipB).
SPI-6 (SCI)	59	51.5	<i>aspV</i> tRNA	Contiene el grupo de genes <i>saf</i> que codifican para fimbrias.
SPI-7 (MPI)	133	44-53	<i>pheU</i> tRNA	De estructura compleja, producto de varios eventos de transferencia horizontal. Contiene los genes para el exopolisacárido capsular antígeno VI, SopE y un pilus tipo IVb.

SPI-8	6.8	38.1	<i>pheV</i> tRNA	Contiene genes de bacteriocinas como factores putativos de virulencia.
SPI-9	16.3	56.7	Bacteriófago lisogénico	Contiene, como factores putativos de virulencia, genes para un SST1 y una proteína semejante a las toxinas RTX.
SPI-10	32.8	46.6	<i>leuX</i> tRNA	Contiene genes para las fimbrias Sef, consideradas como un factor que podría determinar la especificidad por hospederos.

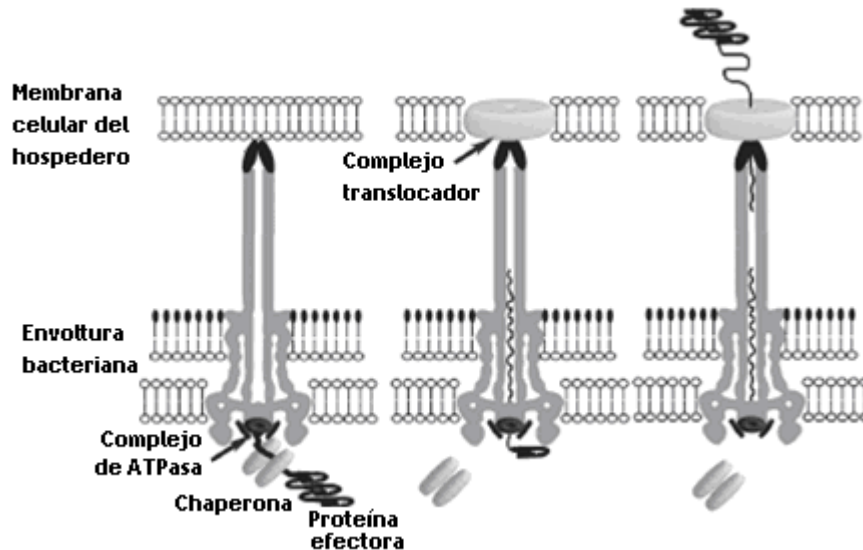
Fuentes: (Kiss *et al.*, 2007), (Marcus *et al.*, 2000), (Hensel, 2004). SPI, *Salmonella* Pathogenicity Island; tRNA, RNA de transferencia; SSTT, Sistema de secreción tipo tres; SCI, *Salmonella* Chromosomal Island; MPI, Major Pathogenicity Island.

### Sistemas de secreción tipo tres (SSTT)

La secreción de proteínas es un requisito esencial para bacterias tanto patógenas como no patógenas, debido a que las proteínas secretadas llevan a cabo diversas funciones. En el caso de bacterias patógenas, son especialmente importantes para la interacción con las células del hospedero (Schmidt & Hensel, 2004). En bacterias Gram-negativas, la presencia de una membrana externa ha provocado el desarrollo de diversos sistemas de secreción estructural y funcionalmente distintos. Dentro de éstos se incluye el Sistema de Secreción Tipo Tres (SSTT), mismo que está evolutivamente relacionado con el flagelo bacteriano (Galán & Wolf-Watz, 2006).

El SSTT fue identificado por primera vez en *S. Typhimurium*. A pesar de llamarse “sistema de secreción”, la principal función de éste no es la secreción de proteínas al medio extracelular, sino su translocación desde el citosol bacteriano hasta el interior de las células del hospedador, a través de una estructura supramolecular conocida como complejo de aguja o inyectisoma, que atraviesa las membranas interna (citoplásmica) y externa de la bacteria (Schmidt & Hensel, 2004). El inyectisoma está compuesto por un par de anillos que se localizan en la membrana citoplásmica, un par de anillos localizados en la membrana externa y una estructura tipo aguja que sobresale varios nanómetros de la

superficie bacteriana, a través de la que se liberan las proteínas que van a ser translocadas (Galán & Wolf-Watz, 2006). Las primeras proteínas que son secretadas por el SSTT se insertan en la membrana del hospedero, formando el llamado complejo translocador. Éste podría acoplarse en la punta de la aguja, formando un poro o canal que permite el paso de las proteínas efectoras a la célula eucarionte (Figura 2) (Galán & Wolf-Watz, 2006).



**Figura 2.** Las proteínas a ser translocadas por el SSTT son reconocidas como un complejo chaperona-efector. Posteriormente, una ATPasa separa a las chaperonas del complejo y media la desnaturalización y el paso de la proteína efectora a través del canal central del inyectisoma. Las primeras proteínas efectoras secretadas se ensamblan en la membrana de la célula del hospedero, formando así un complejo translocador que modula el paso de proteínas efectoras a través de la membrana celular blanco. Una vez en el interior de la célula hospedera, las proteínas efectoras vuelven a plegarse para llevar a cabo sus funciones. Modificado de Galán & Wolf-Watz, 2006.

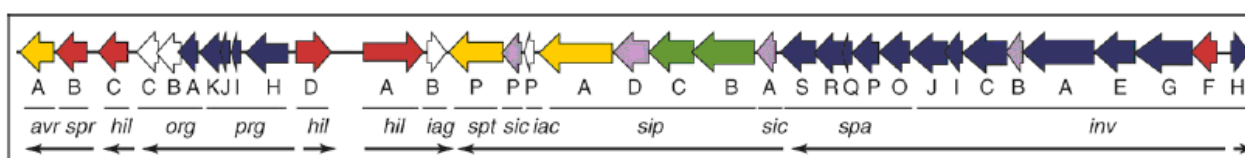
Todos los serovares de *S. enterica* contienen dos SSTT, uno perteneciente a SPI-1 y otro a SPI-2, que son usados por la bacteria para inyectar proteínas efectoras directamente al citoplasma del hospedero en diferentes etapas de la infección.

## SPI-1

SPI-1 es la isla de patogenicidad mejor caracterizada en *Salmonella* (Marcus *et al.*, 2000, Hensel, 2004). Está presente en *S. bongori* y en todos los serovares aislados de *S. enterica*; es debido a esto y a que no contiene genes relacionados con movilidad del DNA,

que se cree que SPI-1 es una adquisición antigua, que data de la separación de los géneros *Escherichia* y *Salmonella* (Hensel, 2004).

En SPI-1 están contenidos todos los genes necesarios para crear un SSTT funcional, así como los que codifican varias proteínas efectoras secretadas y sus proteínas reguladoras. Los genes que codifican las proteínas que forman el SSTT se encuentran en los operones *prg/org* e *inv/spa*, mientras que las proteínas que conforman el complejo translocador que se introduce en la membrana del hospedero y las efectoras primarias se encuentran codificadas en el operón *sic/sip* (Figura 3). Existen también otras proteínas efectoras que se encuentran codificadas fuera de SPI-1 pero forman parte del regulón de SPI-1 y son translocadas por el SSTT codificado en esta isla, como SlrP, SopA, SopD, SopE, SopE2 y SspH1 (Tabla 1) (Ellermeier & Slauch, 2007).



**Figura 3.** Organización genética de SPI-1. Los genes que codifican las proteínas que conforman el inyectisoma del SSTT están en azul, los que codifican el translocón en verde, los que codifican las proteínas efectoras en amarillo, los que codifican las chaperonas en morado y los que codifican las proteínas reguladoras en rojo. Se desconoce la función de los genes en color blanco. Tomado de Ellermeier & Slauch, 2007.

Los genes de SPI-1 son necesarios durante las primeras etapas de la infección por *Salmonella*, ya que codifican las proteínas efectoras necesarias para invadir y colonizar a las células del hospedador. Dentro de estas proteínas están incluidas SipA, SipC, SopB/SigD, SopD, SopE, SopE2, SptP, SipD, SlrP, SopA, SipB, AvrA y SspH (Ly & Casanova, 2007). Las primeras 6 inducen directa o indirectamente los rearrreglos del citoesqueleto de actina y la formación de las prolongaciones membranales que llevan a la internalización de la bacteria (McGhie *et al.*, 2009). SopE, SopE2, SopB y SopD son factores intercambiadores de guanina (GEF, de Guanine Exchange Factor) que activan a GTPasas eucariontes de la familia Rho, reguladores claves de la arquitectura de la célula huésped, como AktA, Cdc42, Rac y RhoG, para estimular el ensamblaje de actina vía el complejo Arp2/3 (Criss & Casanova, 2003). También la señalización mediada por algunas

RhoGTPasas, como Cdc42, puede alterar la expresión genética del hospedero durante la infección (Schlumberger & Hardt, 2006). SipA y SipC interactúan directamente con la actina, la primera promueve el inicio de su polimerización y la segunda forma haces de actina (Hayward & Koronakis, 2002, Patel & Galán, 2005). SopB modula la secreción de fluidos al aumentar la secreción de cloro gracias a su actividad de fosfatidilinositol fosfatasa (Ly & Casanova, 2007).

En conjunto, las acciones realizadas por las proteínas efectoras de SPI-1 tienen como consecuencia el rearrreglo del citoesqueleto para formar prolongaciones membranales, inducir las vías de las proteínas activadas por mitógenos (MAPK) y desestabilizar las uniones estrechas. La activación de la vía de las MAPK lleva a la producción de citocinas proinflamatorias que estimulan la transmigración de leucocitos polimorfonucleares y la respuesta inflamatoria, lo que finalmente produce la diarrea (McGhie *et al.*, 2009, Ly & Casanova, 2007, Haraga *et al.*, 2008, Schlumberger & Hardt, 2006).

SptP revierte los rearrreglos del citoesqueleto y retorna la célula del hospedero a su estado basal, gracias a su dominio GAP (activador de GTPasas), que estimula la actividad GTPasa de Cdc42 y Rac1 (previamente activadas por SopE, SopE2 y SopB), con lo que las desactiva (McGhie *et al.*, 2009). La Tabla 2 resume las funciones que desempeñan las proteínas efectoras que son translocadas a través del SSTT de SPI-1.

**Tabla 2.** Proteínas efectoras translocadas por el SSTT codificado en SPI-1.

<b>Efector</b>	<b>Localización del gen</b>	<b>Función</b>
AvrA	SPI-1	Cisteín proteasa que inhibe la señalización del factor nuclear (NF)- $\kappa$ B y la producción de interleucina (IL)-8. También previene la ubiquitinación de catenina, reprimiendo así la apoptosis e inflamación.
SipA	SPI-1	Promueve el ensamblaje de filamentos de actina e inhibe el desensamblaje de ésta; estimula la migración de PMN y altera las uniones estrechas. Coopera con SifA para mediar el posicionamiento perinuclear de la SCV.
SipB	SPI-1	Componente del translocón que se une a colesterol; activa

		señalización de apoptosis a través de la activación de caspasa 1 en macrófagos y células dendríticas.
SipC	SPI-1	Componente del translocón que modula la translocación de proteínas efectoras y promueve la nucleación y la formación de filamentos de actina, principalmente para la formación de las prolongaciones membranales.
SipD	SPI-1	Componente del translocón que regula la secreción de proteínas efectoras de SPI-1.
SlrP	Fuera de SPIs	Función desconocida, podría contribuir a la especificidad por hospederos.
SopA	Fuera de SPIs	Conserva la integridad de la SCV e induce la trans migración de PMN.
SopB/SigD	SPI-5	Activa a Cdc42, RhoG, AktA y la secreción de cloro y fluidos mediante su actividad de inositol fosfatasa; promueve la supervivencia en células epiteliales y altera las uniones estrechas. También promueve la fisión membranal, la formación del macropinosoma y está involucrada en la biogénesis y posicionamiento de la SCV.
SopD*	Fuera de SPIs	Promueve la fisión membranal y la formación del macropinosoma. En ratón contribuye a la virulencia y persistencia de la bacteria; induce la secreción de fluidos y promueve la invasión de células T84.
SopE	Bacteriófago SopEΦ	Activa a Cdc42, Rac1 y RhoG por su actividad de GEF, principalmente para la formación de las prolongaciones membranales; induce una respuesta proinflamatoria, promueve la fusión de la SCV con endosomas tempranos y altera las uniones estrechas.
SopE2	En la cercanía de restos de bacteriófagos	Activa a Cdc42 por su actividad de GEF para la formación de las prolongaciones membranales; induce una respuesta proinflamatoria, aumenta la expresión de óxido nítrico sintasa inducida (iNOS) en macrófagos y altera las uniones

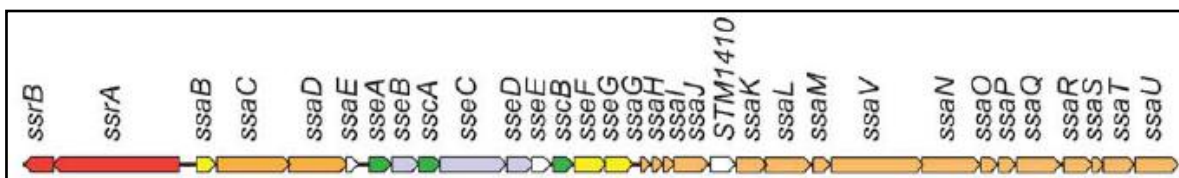
		estrechas.
SptP	SPI-1	Después de la internalización de <i>Salmonella</i> , regresa el citoesqueleto del hospedero a su estado basal y disminuye la respuesta proinflamatoria.
SspH1*	Bacteriófago Gifsy-3	Inhibe la señalización de (NF)-κB y la secreción de interleucina IL-8, lo que disminuye la respuesta proinflamatoria. Tiene actividad de ubiquitin ligasa.

\*También secretados por el SSTT de SPI-2. Fuentes de tabla: (Ly & Casanova, 2007), (McGhie *et al.*, 2009), (Haraga *et al.*, 2008), (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009). SCV, *Salmonella* Containing Vacuole; PMN, Leucocitos polimorfonucleares; GEF, Guanine Exchange Factor; AvrA, Avirulence Factor A; Sip, *Salmonella* invasion protein; Sop, *Salmonella* outer protein; Sig, *Salmonella* invasion gene; SptP, *Salmonella* protein tyrosine phosphatase.

## SPI-2

SPI-2 contiene más de 40 genes y puede dividirse en dos segmentos, que probablemente fueron adquiridos en diferentes eventos de transferencia horizontal (Marcus *et al.*, 2000). El primero es un segmento de 15 kb que contiene los genes *ttr* que codifican para el regulador y los componentes estructurales de una tetracionato reductasa, que capacita a la bacteria para llevar a cabo la respiración en condiciones de anaerobiosis (Hensel, 2000). Este segmento es dispensable para la virulencia y está presente tanto en *S. enterica* como en *S. bongori*. El segundo segmento localizado en SPI-2 es un fragmento de 25 kb que es esencial para la patogénesis y únicamente se encuentra en *S. enterica*. Esto sugiere que el segundo segmento es una adquisición más reciente, que facilitó que esta especie de *Salmonella* pudiera colonizar sistémicamente a hospederos de sangre caliente (Schmidt & Hensel, 2004). Este fragmento de 25 kb incluye a los genes que codifican el inyector del SSTT, las proteínas efectoras que serán translocadas a través de éste y un sistema de regulación de dos componentes que regula no sólo su propia expresión, sino también la del aparato de secreción y la de las proteínas efectoras secretadas (Fass & Groisman, 2009). Los genes que codifican para componentes del SSTT se designaron *ssa* (secretion system apparatus), los que codifican las proteínas efectoras *sse* (secretion system effector), los que codifican chaperonas se designaron *ssc* (secretion system chaperone) y los

que codifican las proteínas reguladoras de los genes de virulencia en la isla se denominaron *ssr* (*secretion system regulator*) (Figura 4) (Hensel, 2000).



**Figura 4.** Organización genética de SPI-2. Únicamente se representa el fragmento que es esencial para la virulencia. Los genes que codifican a las proteínas que conforman la estructura del SSTT están en naranja, los que codifican a proteínas que forman el translocón en lila, los que codifican a las proteínas efectoras en amarillo, los que codifican a las chaperonas en verde y los que codifican a las proteínas reguladoras en rojo. Se desconoce la función de los genes en color blanco. Tomado de Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010.

SPI-2 es de importancia crucial durante las fases tardías de la infección por *Salmonella*, ya que los genes que en ella se localizan, codifican las proteínas necesarias para que la bacteria sobreviva y se replique intracelularmente. En contraste a lo que ocurre con el SSTT de SPI-1, en este nicho los efectores de SPI-2 probablemente son expresados y translocados continuamente para asegurar la supervivencia y replicación de la bacteria durante periodos largos de tiempo (Schlumberger & Hardt, 2006).

A pesar de que los papeles individuales de las proteínas efectoras del SSTT de SPI-2 no están claramente definidos, se sabe que están involucradas en el mantenimiento de la vacuola en su posición cerca del MTOC y del aparato de Golgi, en la promoción de la replicación intracelular y en la formación de los filamentos inducidos por *Salmonella* (Sifs, por sus siglas en inglés) (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009, Bakowski *et al.*, 2008).

Las proteínas efectoras translocadas por el SSTT de SPI-2 más estudiadas hasta ahora son SifA, SseG, SseF, SseJ, SopD2 y PipB2 (Haraga *et al.*, 2008). SifA, SseG y SseF son necesarias para redireccionar a las vesículas de transporte exocíticas hacia la SCV (McGhie *et al.*, 2009). Se ha sugerido que SseG y SseF podrían mantener a la SCV en la región perinuclear al formar un complejo funcional que, de alguna manera, una a la vacuola con el aparato de Golgi o controle la actividad de la dineína (McGhie *et al.*, 2009). SifA es más conocida por su papel en la formación de Sifs, un proceso aparentemente ligado a la conservación de la integridad de la SCV y al que también contribuye SopD2 (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009). PipB2 y SseJ también cooperan en la formación de las Sifs al



modular la agregación de compartimentos endosomales (McGhie *et al.*, 2009). Otras proteínas efectoras de importancia son SseL, SspH1 y SspH2, que intervienen en las vías de ubiquitinación de la célula hospedera. Esta última, junto con SteC y SseI también está involucrada en la polimerización de actina asociada a la vacuola, llamada VAP (Vacuole-associated Actin Polymerization) (Steele-Mortimer, 2008, Ibarra & Steele-Mortimer, 2009).

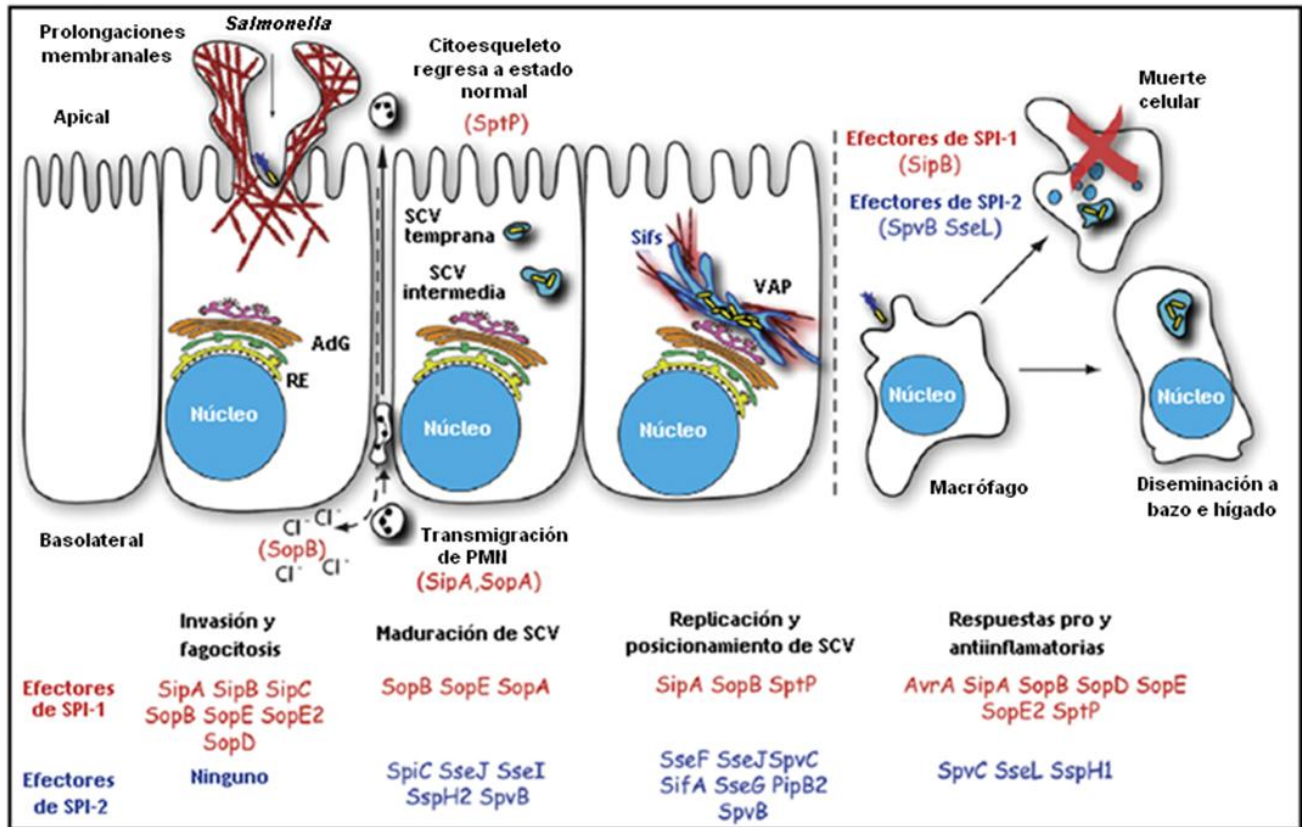
La Tabla 3 resume las funciones descritas hasta ahora para las proteínas efectoras que son translocadas por el SSTT de SPI-2. La figura 5 esquematiza las diferentes etapas de la infección por *Salmonella* y los efectores de cada isla involucrados en cada una.

**Tabla 3.** Proteínas efectoras translocadas por el SSTT codificado en SPI-2

<b>Efeotor</b>	<b>Localización del gen</b>	<b>Función</b>
PipB	SPI-5	Desconocida
PipB2	Fuera de SPIs	Movimiento anterógrado de Sifs y endosomas tardíos o lisosomas; reclutamiento de kinesina-1 a la SCV.
SifA	SPI-2	Formación de Sifs; posicionamiento, movilidad y mantenimiento de integridad de la SCV; formación de haces de actina; redirección de vesículas endocíticas.
SifB	Fuera de SPIs	Desconocida
SopD2	Fuera de SPIs	Formación de Sifs; requerida para la replicación bacteriana eficiente en macrófagos y en ratones.
SpiC/SsaB	SPI-2	Inhibición de fusión de vesículas con la SCV; formación de VAP y de Sifs; controla el orden de las proteínas exportadas a través del SSTT de SPI-2.
SseF	SPI-2	Posicionamiento y movilidad de la SCV; reclutamiento de dineína a la SCV; formación de Sifs y haces de microtúbulos alrededor de la SCV; redirección de vesículas de transporte a la SCV.
SseG	SPI-2	Mismas funciones que SseF.

SseI	Bacteriófago Gifsy-2	Rearreglos de actina asociados a la SCV; promueve movilidad de macrófagos.
SseJ/SifC	Fuera de SPIs	Involucrada en dinámicas de la membrana de SCV, antagoniza la estabilización por SifA y regula negativamente a los Sifs.
SseL	Fuera de SPIs	Desubiquitinasa; involucrada en apoptosis de macrófagos y en la disminución de la respuesta inflamatoria.
SspH2	En la cercanía de restos de bacteriófagos	Relacionada con VAP, inhibe la polimerización de actina <i>in vitro</i> .
SteC	Fuera de SPIs	Requerida para remodelación de actina durante VAP.

Fuentes de tabla: (McGhie *et al.*, 2009), (Haraga *et al.*, 2008), (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009). SCV, *Salmonella* Containing Vacuole; VAP, Vacuole-associated Actin Polymerization; Sif, *Salmonella* induced filaments; Ssa, secretion system apparatus; Sse, secretion system effector; Ssc, secretion system chaperone; Ssr, *secretion* system regulator; Sop, *Salmonella* outer protein; Ste, *Salmonella* translocated effector; Pip, Pathogenicity island-encoded proteins.



**Figura 5.** Representación de las principales etapas de la infección por *Salmonella* que muestra las proteínas efectoras de SPI-1 y SPI-2 involucradas en cada una de ellas. Inicialmente, *Salmonella* induce la formación de prolongaciones membranales mediante la reorganización del esqueleto de actina para así mediar su propia internalización. La bacteria permanece en vacuolas intracelulares llamadas SCV, que maduran a través de ciertas interacciones con la vía endocítica y se localizan en la región perinuclear de la célula hospedadora. Una vez ahí, comienzan a replicarse, se forman los filamentos inducidos por *Salmonella* (Sifs) y se da la polimerización de actina asociada a la vacuola (VAP). La secreción de iones de cloro y la trans migración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) contribuyen a que se presente la diarrea y la inflamación intestinal en serovares asociados a enteritis. Aquellos serovares que provocan una infección sistémica ingresan a macrófagos, dentro de los cuales se diseminan principalmente al bazo y al hígado a través del sistema retículoendotelial. AdG, Aparato de Golgi; RE, retículo endoplásmico. Modificado de McGhie *et al.*, 2009.

## Regulación de la expresión génica de las islas de patogenicidad

Como otros genes de virulencia, los pertenecientes a las islas de patogenicidad no son expresados constitutivamente, sino que están regulados de manera que sólo se expresen en el lugar y momento adecuados, es decir, en las condiciones en las que sea requerida su función (Schmidt & Hensel, 2004). Esta coordinación entre condiciones externas y activación de redes reguladoras específicas promueve una efectiva progresión de la infección. En el caso de genes de virulencia bacterianos, la expresión está regulada por factores externos, como la osmolaridad, el pH, la concentración de cationes, entre otros, que son detectados por el patógeno en ciertos microambientes del hospedero (Hansen-Wester & Hensel, 2001). Por lo tanto, para bacterias que deben ser capaces de moverse en diferentes ambientes, la rápida adaptación tanto de su constitución fisiológica como bioquímica a las condiciones ambientales prevalentes es una prioridad (Rhen & Dorman, 2005). Para esto se requiere que haya una estricta coordinación entre la expresión genética y la detección de condiciones ambientales (Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010). Por lo tanto, algo crucial en el conocimiento general de la patogénesis bacteriana es entender estas respuestas adaptativas a un nicho en particular, así como las redes reguladoras involucradas en dichas respuestas (Ellermeier & Schlauch, 2007).

Muchos de los genes relacionados con virulencia en *Salmonella* fueron adquiridos por transferencia horizontal. Se cree que inicialmente, para evitar los efectos potencialmente dañinos que podría tener la expresión no controlada de estos genes (Rhen & Dorman, 2005) y facilitar la integración del DNA recién adquirido a la red reguladora del hospedero, la proteína H-NS podría silenciar a los genes recién adquiridos (Fang & Rimsky, 2008, Dorman, 2007). H-NS pertenece al grupo de las NAPs (Proteína Asociada al Nucleoide, por sus siglas en inglés); éstas se unen directamente al DNA en loci específicos, alterando la topología de éstos, para así dirigir selectivamente los efectos de superenrollamiento en las regiones promotoras. Se ha descrito que H-NS podría tener un papel como “centinela del genoma”, ya que generalmente silencia genes adquiridos por transferencia horizontal, al reconocer y unirse a DNA con alto contenido de A+T, como las PAIs (Dorman, 2007). En miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, H-NS puede reclutar a Hha, otra NAP, para formar complejos heteroméricos que se unen fuertemente al DNA (Baños *et al.*, 2009).

Los cambios en condiciones ambientales como pH, temperatura, osmolaridad y fase de crecimiento, al tener consecuencias en el grado de superenrollamiento del DNA, afectan la expresión de los genes regulados por H-NS (Fang & Rimsky, 2008). Por ejemplo, aumentar la temperatura remodela el DNA al causar un desplazamiento del vértice de curvatura, lo que provoca que la afinidad de H-NS por el DNA disminuya. Por lo tanto, un mecanismo de regulación posible sería que los blancos de H-NS fueran regiones de DNA cuyo grado de curvatura dependiera de factores ambientales (Dorman, 2007).

Otro aspecto importante a considerar al analizar la regulación de la expresión genética en bacterias es que la bacteria requiere de un mecanismo que integre los genes de reciente adquisición a un circuito de regulación preexistente (Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010). Esto posiblemente sucedió en el caso de las PAIs, ya que generalmente forman parte de redes de regulación complejas que involucran reguladores codificados por la misma u otra isla, además de reguladores globales localizados en el cromosoma o en plásmidos. Los reguladores de las PAIs también pueden estar involucrados en la regulación de genes que se encuentren fuera de éstas (Schmidt & Hensel, 2004).

## **Regulación genética de SPI-1**

### *Reguladores con efecto positivo*

En el control de la invasión, *Salmonella* involucra numerosos sistemas reguladores, tanto específicos como globales. Esto sugiere que regular estrictamente la expresión de los genes involucrados en este proceso es esencial en la patogénesis (Altier, 2005). El regulador central de los genes de SPI-1 y por tanto de la invasión, es HilA (hyper-invasive locus A), codificado en SPI-1 e identificado por primera vez como un locus que al sobre-expresarse confería un fenotipo hiperinvasivo en células HEp-2 (Ellermeier & Schlauch, 2007). HilA tiene un dominio carboxilo terminal de función desconocida y un dominio amino terminal que es homólogo al dominio de unión a DNA de la familia de activadores transcripcionales OmpR/ToxR (Jones, 2005). Sin embargo, dado que carece del dominio aceptor de grupo fosfato típico de esta familia, se considera que la actividad de HilA no está regulada por modificaciones postraduccionales (Bajaj *et al.*, 1996). HilA actúa como activador clásico de los operones *inv/spa* y *prg/org* (Altier, 2005) y se autorregula

negativamente a través de un mecanismo desconocido (De Keersmaecker *et al.*, 2005). HilA induce la expresión de InvF, un activador perteneciente a la familia AraC, que está codificado en el primer gen del operón *inv/spa*. InvF, junto con la chaperona SicA, induce la expresión del operón *sip/sic* uniéndose directamente a sus regiones reguladoras (Darwin & Miller, 2000). Además, InvF controla la expresión de SopB y SopE, que están codificados fuera de SPI-1 (Ellermeier & Slauch, 2007).

La expresión de HilA está directamente regulada por tres reguladores pertenecientes a la familia AraC: HilD, HilC y RtsA. Los dos primeros están localizados dentro de SPI-1 y RtsA se encuentra en una inserción localizada cerca del gen de tRNA<sup>PheU</sup>. Las tres proteínas tienen un dominio de unión al DNA localizado en el extremo carboxilo terminal, con el que se unen al promotor de *hila*. Se ha reportado que inducen la expresión de *hila* al desplazar al silenciador H-NS del promotor de éste, lo que permite su transcripción (Ellermeier & Slauch, 2007). Adicionalmente, se ha reportado que HilD y HilC podrían inducir la inducción de *invF* de manera independiente de HilA, ya que se unen a un promotor de *invF* que se encuentra corriente arriba del promotor que es dependiente de HilA (Akbar *et al.*, 2003).

La expresión de SPI-1 también involucra la participación de reguladores globales de la expresión genética en *Salmonella*, entre ellos se encuentran HU, Fis, el sistema de dos componentes BarA/SirA y el sistema Csr. HU y Fis son NAPs que tienen un efecto de regulación positiva sobre *hila*, pero sólo en presencia de HilD (Schechter *et al.*, 2003). Se ha sugerido que estos dos reguladores podrían unirse al promotor de *hila* y promover su inducción mediada por HilD o podrían inducir la expresión de *hila* indirectamente, al aumentar los niveles o la actividad de HilD. Además de promover la expresión de los genes de SPI-1, se ha reportado que Fis tiene un efecto positivo en la expresión de SPI-2 (Kelly *et al.*, 2004) y que está involucrado en los mecanismos de regulación necesarios durante la transición del lumen intestinal al nicho intracelular (Dorman, 2009).

BarA/SirA es un sistema de dos componentes que controla positivamente los genes de SPI-1 al inducir la expresión de *hila*, pero sólo en presencia de HilD (Ellermeier & Slauch, 2007). Los sistemas de dos componentes le permiten a la bacteria responder a cambios en el ambiente al detectar señales extracelulares específicas. Están compuestos por una cinasa detectora de señales y un regulador de respuesta; la primera detecta un estímulo

específico y en respuesta a esto, se autofosforila en un residuo de histidina usando ATP. Posteriormente transfiere ese grupo fosfato a un residuo de aspartato del regulador de respuesta (Mitrophanov & Groisman, 2008). La fosforilación del regulador de respuesta provoca un cambio en sus propiedades bioquímicas, activándolo de manera que pueda llevar a cabo su función biológica. Dependiendo de su dominio de respuesta, ésta puede ser unión al DNA o RNA, actividades enzimáticas o interacciones proteína-proteína (Gao *et al.*, 2007). En el sistema de dos componentes BarA/SirA, BarA es la cinasa detectora de señales ambientales y SirA el regulador de respuesta. Este sistema, además de los genes de SPI-1, controla numerosos genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos, la movilidad, la formación de biopelículas y la invasión (Ellermeier & Slauch, 2007). Ortólogos de BarA/SirA están presentes en muchas especies bacterianas, incluyendo *E. coli* (UvrY/BarA), *Pseudomonas spp.* (GacA/GacS), *Vibrio cholerae* (VarA/VarS), *Erwinia carotovora* (ExpA/ExpS) y *Legionella pneumoniae* (LetA/LetS) (Goodier & Ahmer, 2001).

El sistema Csr está formado por una proteína de unión a RNAs llamada CsrA y dos RNAs no traducidos llamados CsrB y CsrC. CsrA actúa postranscripcionalmente al unirse a sus mRNAs blanco en la región donde se encuentra el sitio de unión a ribosoma (RBS, por sus siglas en inglés). Esta unión altera la expresión del mRNA ya sea positivamente, al estabilizar al transcrito, o negativamente, evitando la unión de los ribosomas a éste, impidiendo su traducción y de esta manera induciendo su decaimiento o degradación (Altier, 2005, Babitzke & Romeo, 2007). Inicialmente, CsrA fue identificada en *Escherichia coli* como un regulador global del metabolismo central de carbono, principalmente de la biosíntesis de glicógeno, así como de los genes que participan en la biosíntesis del flagelo y la formación de biopelículas (Romeo, 1998). Los RNAs no traducidos CsrB y CsrC fueron descubiertos cuando CsrA fue purificada como un complejo ribonucleoprotéico. Ambos contienen en su secuencia varios sitios de unión para CsrA, por lo que regulan la actividad de esta proteína al secuestrarla y evitar que se una a los transcritos de sus genes blanco (Babitzke & Romeo, 2007). En *Salmonella* se ha demostrado que tanto CsrB como CsrC actúan como reguladores positivos al contrarrestar el efecto negativo que CsrA tiene sobre los genes de SPI-1 (Altier, 2005).

### *Reguladores con efecto negativo*

Dentro de SPI-1, el regulador central, HilA, actúa como represor de su propia expresión de manera directa, ya que se ha reportado que es capaz de unirse a su región reguladora (De Keersmaecker *et al.*, 2005). Por otro lado, uno de los reguladores negativos más importantes de SPI-1 es H-NS, el cual reprime directamente la expresión de *hilA* (Schechter & Lee, 2001). También se ha demostrado que es capaz de reprimir la expresión de *hilD* (Olekhovich & Kadner, 2007).

Hha es otra NAP que tiene efectos negativos sobre la expresión de los genes de SPI-1, al reprimir la expresión de *hilA* (Fahlen *et al.*, 2001), pudiendo actuar junto con H-NS en condiciones de baja osmolaridad (Olekhovich & Kadner, 2007). Además, Hha también reprime la expresión de genes que son regulados por HilA, como *invF*, *prgH* y *sipC* (Fahlen *et al.*, 2001).

Otros reguladores negativos de SPI-1 son HilE y la proteasa Lon, ambos actuando a nivel de HilD. Se ha reportado que HilE se une a HilD, evitando así que éste induzca la expresión de *hilA* (Jones, 2005). A su vez, se ha mostrado que Lon degrada a HilD, pues en una mutante en *lon* se acumula HilD y se incrementa la expresión de los genes de SPI-1 (Takaya *et al.*, 2005).

## **Regulación genética de SPI-2**

### *Reguladores con efecto positivo*

El sistema de dos componentes SsrA/B, codificado en SPI-2, es el regulador central de la isla (Figura 4). SsrA es la cinasa detectora de señales ambientales y SsrB su regulador de respuesta. Este último se une directamente a los promotores de los genes de SPI-2 y es esencial para la expresión del SSTT codificado en esta isla y sus proteínas efectoras, incluyendo aquéllas que se encuentran fuera de SPI-2. Se ha reportado que SsrB induce la expresión de los genes de SPI-2 al antagonizar la represión mediada por H-NS sobre los promotores de estos genes (Walthers *et al.*, 2007).

Entre los reguladores globales que participan en la regulación positiva de SPI-2 se encuentra SlyA, que podría funcionar como desrepresor de *ssrA*, a cuyo promotor se une directamente (Walthers *et al.*, 2007). Asimismo, los sistemas de dos componentes



EnvZ/OmpR y PhoP/PhoQ, reguladores globales de *Salmonella*, participan en la inducción de la expresión intracelular de SPI-2. El regulador de respuesta OmpR se une al promotor de *ssrA* directamente, aunque no parece ser un antagonista de H-NS, pues también se requiere para la expresión de SsrA/B aún en ausencia de H-NS (Fass & Groisman, 2009). El papel de PhoP/PhoQ es controversial, pues aunque se ha reportado que es requerido para la supervivencia dentro de macrófagos (Miller *et al.*, 1989), para la inducción de SPI-2 bajo ciertas condiciones ambientales (Deiwick *et al.*, 1999) y que se une directamente al promotor de *ssrB* (Bijlsma & Groisman, 2005), existen reportes en donde se detecta expresión de SPI-2 aún en ausencia de PhoP (Valdivia & Falkow, 1997). También se ha mostrado que PhoP/PhoQ no es requerido para la activación de SPI-2 en presencia de OmpR fosforilado (Kim & Falkow, 2004).

Fis e IHF, ambas NAPs, son requeridas para la expresión de SPI-2. Fis es un activador directo, al unirse a la región promotora de *ssrA*. Sin embargo, Fis también podría estar actuando indirectamente al controlar la expresión de otros genes reguladores de la isla como *phoP* (Fass & Groisman, 2009). IHF se ha propuesto como un coordinador entre la adaptación a la fase estacionaria y la regulación de genes de virulencia (Mangan *et al.*, 2006).

#### *Reguladores con efecto negativo*

Al igual que para SPI-1, H-NS es el regulador negativo más importante de los genes de SPI-2, al unirse directamente a sus regiones reguladoras, incluyendo al operón *ssrAB*, que codifica para el sistema SsrA/B, el regulador central de SPI-2 (Walthers *et al.*, 2007).

Las NAPs Hha y YdgT también reprimen la expresión de los genes de SPI-2, al formar complejos heterodiméricos con H-NS. Sin embargo, nunca se ha demostrado su unión directa a los promotores de los genes de SPI-2 (Silphaduang *et al.*, 2007).

#### **Estímulos ambientales que inducen la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2**

Para el caso de *Salmonella*, se ha involucrado a varias condiciones ambientales en la inducción de los genes de las SPIs. El nivel de oxígeno, la osmolaridad y el pH son condiciones ambientales que afectan la expresión de genes involucrados en el proceso de

invasión (Hansen-Wester & Hensel, 2001) y, dado que ésta ocurre en el íleon, se ha supuesto que las condiciones que la bacteria encuentra en este nicho incluirían niveles bajos de O<sub>2</sub>, (el lumen intestinal es anaeróbico, pero el borde epitelial se considera microaerofílico), una alta osmolaridad y un pH alcalino (Altier, 2005). Se ha propuesto que ppGpp (tetrafosfato de guanosina), involucrado en el control de la respuesta a condiciones estrictas de crecimiento, es el factor responsable de la activación de los genes de SPI-1 en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno (Thompson *et al.*, 2006).

La concentración y composición de los ácidos grasos de cadena corta que se encuentran en el íleon distal son una señal importante para la expresión de los genes de SPI-1 y por lo tanto para la invasión por *Salmonella*. Por otro lado, los ácidos grasos encontrados en el intestino grueso, como propionato y butirato, inhiben su expresión y la invasión. Se ha reportado recientemente que el encargado de detectar las concentraciones de acetato, un ácido graso que se encuentra en el intestino delgado, podría ser el sistema de dos componentes BarA/SirA, ya que puede activarse en presencia de ácidos grasos de cadena corta. Una vez activado, el sistema BarA/SirA es capaz de activar la expresión de SPI-1 (Lawhon *et al.*, 2002, González Chávez *et al.*, 2010).

Por otro lado, para la inducción de los genes de SPI-2, necesarios para la supervivencia intracelular de *Salmonella*, se requiere de otros estímulos, algunos detectados por los sistemas de dos componentes EnvZ/OmpR y PhoP/PhoQ, ya que se ha reportado que ambos están involucrados en la adaptación bacteriana al ambiente intracelular del hospedero.

OmpR, esencial para la expresión de SPI-2, responde a cambios en los niveles de osmolaridad (Fass & Groisman, 2009). Se ha reportado que la activación de SPI-2 dependiente de OmpR puede ser estimulada *in vitro* por quelantes de cationes o por un cambio de medio rico a medio mínimo con pH ácido, por lo que se cree que OmpR está involucrado en la inducción de genes de SPI-2 en respuesta a pH ácido (Kim & Falkow, 2004). Por otro lado, se ha demostrado que PhoP también es requerido para la inducción de SPI-2 en medio con pH ácido (Rhen & Dorman, 2005). Además, PhoP/PhoQ podría controlar la expresión de genes en respuesta a concentraciones extracelulares de cationes divalentes, especialmente de Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> o de bajas concentraciones de fosfato (Hensel, 2000, Deiwick *et al.*, 1999). Dichas condiciones ambientales, probablemente encontradas

por la bacteria durante la fase intracelular de la infección, provocan la activación de genes requeridos para la supervivencia dentro de la vacuola, incluyendo a los de SPI-2.

### III. Antecedentes

A pesar de que tradicionalmente los papeles de SPI-1 y SPI-2 durante la infección de *Salmonella* habían estado claramente delimitados, desde hace unos años algunos estudios han puesto en duda la separación clásica de las funciones de ambas islas. Esto en parte con base en la evidencia de que genes de SPI-2 se expresan antes de la penetración al epitelio intestinal (Brown *et al.*, 2005) y debido a que, en modelos de infección de enterocolitis como el intestino ligado de bovino, se ha visto que mutantes en SPI-2 están atenuadas (Coombes *et al.*, 2005). Por lo tanto, a pesar de que aún no se conoce bien cómo la bacteria alterna la expresión de los genes de una isla a los de la otra, es evidente que ambos regulones podrían estar involucrados tanto en la invasión como en la supervivencia y replicación intracelular (Steele-Mortimer, 2008).

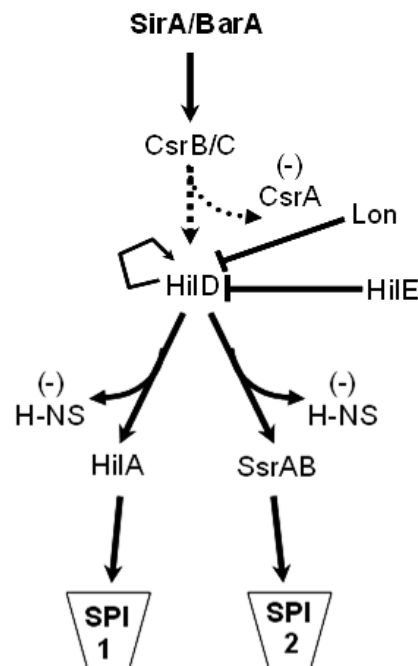
A este respecto, nuestro grupo de investigación ha demostrado que existe un novedoso mecanismo de comunicación transcripcional entre los genes de ambas islas. Dicho mecanismo se observa cuando *Salmonella* crece en el medio de cultivo LB y está mediado por el regulador HilD, codificado en SPI-1, que induce de manera secuencial la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 en estas condiciones de crecimiento (Bustamante *et al.*, 2008).

Estudios posteriores en nuestro laboratorio han demostrado que la expresión de SPI-1 y SPI-2 en estas condiciones, depende de una cascada de regulación en la que están involucrados el sistema de dos componentes BarA/SirA y el sistema Csr (Martínez *et al.*, sometido).

Con base en esto y en los resultados generados por otros grupos, proponemos que la cascada de activación de los genes de SPI-1 y SPI-2 se iniciaría con la expresión del sistema de dos componentes BarA/SirA y la activación de éste por un estímulo extracelular, que podría ser el acetato. También se ha reportado que el acetil fosfato producido intracelularmente es capaz de activar tanto a BarA como a SirA directamente (González Chávez *et al.*, 2010, Teplitski *et al.*, 2006). Una vez activada, SirA induce la expresión de los RNAs no codificantes CsrB y CsrC, al unirse directamente a la región reguladora de éstos. CsrB y CsrC se unen a la proteína CsrA, secuestrándola y contrarrestando así el efecto postranscripcional negativo que ejerce dicha proteína sobre el mRNA de *hilD*

(Martínez *et al.*, sometido). La apropiada concentración y actividad de HilD se mantiene por mecanismos de reguladores positivos y negativos adicionales, incluyendo la auto-regulación positiva de HilD (Ellermeier & Slauch, 2007, Olekhnovich & Kadner, 2007), la degradación de HilD mediada por Lon (Boddicker & Jones, 2004, Takaya *et al.*, 2005), su inactivación por la interacción directa con HilE (Baxter *et al.*, 2003), así como un circuito regulador positivo que involucra a los reguladores HilD, HilC y RtsA (Ellermeier *et al.*, 2005).

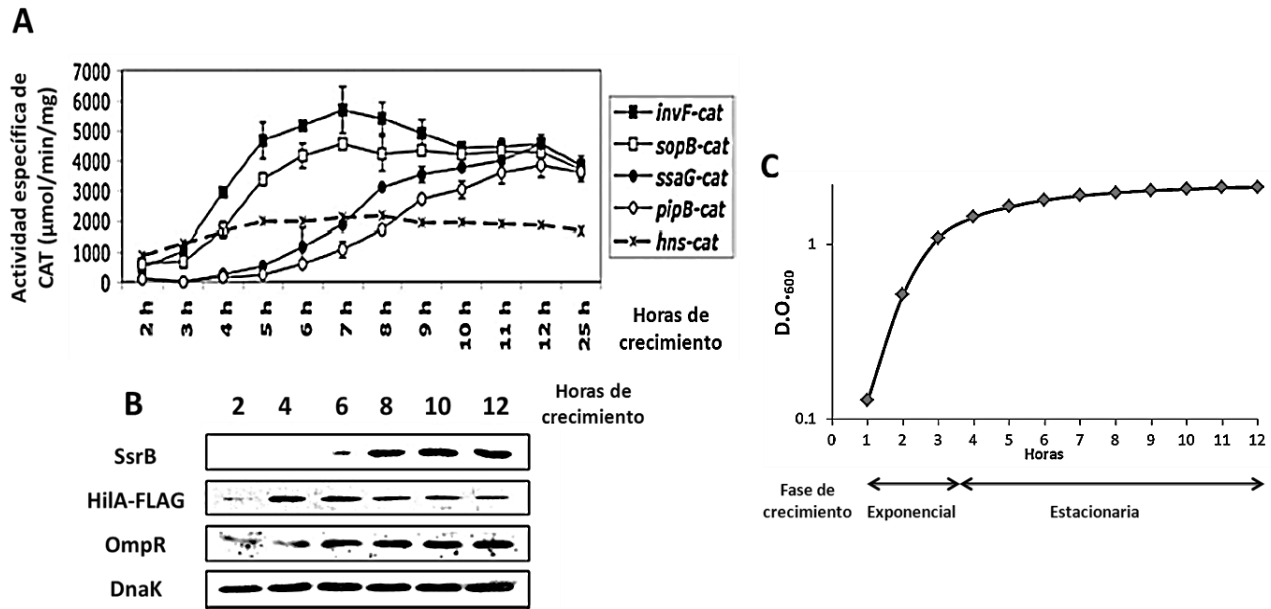
La cascada reguladora diverge cuando HilD, en diferentes fases de la curva de crecimiento de *Salmonella* en LB, induce la expresión de HilA y el sistema SsrA/B, los reguladores de SPI-1 y SPI-2, respectivamente, al unirse directamente a sus genes y quitar el efecto negativo que el represor global H-NS ejerce sobre sus promotores (Bustamante *et al.*, 2008a, Schechter & Lee, 2001, Schechter *et al.*, 1999). Una vez que HilA y SsrA/B se expresan, inducen la expresión del resto de los genes de SPI-1 y SPI-2, respectivamente (Fass & Groisman, 2009, Altier, 2005, Jones, 2005, Ellermeier & Slauch, 2007). La figura 6 describe la cascada reguladora completa.



**Figura 6.** Representación de la cascada reguladora que controla la expresión de los regulones de SPI-1 y SPI-2, en fase estacionaria temprana y fase estacionaria tardía, respectivamente, durante el crecimiento de *Salmonella* en medio LB. Tomado de Martínez *et al.*, sometido.

En condiciones de cultivo en laboratorio, se ha estudiado la regulación de los genes de SPI-1 y SPI-2 usando diferentes medios de cultivo. El crecimiento de *Salmonella* en medios ricos en nutrientes, de alta osmolaridad y pH alcalino (como el medio LB) induce la expresión de los genes pertenecientes al regulón de SPI-1, probablemente porque estos medios de crecimiento simulan las condiciones que la bacteria encuentra en el intestino del hospedero (Lundberg *et al.*, 1999, Miao & Miller, 2000). Por otro lado, el empleo de medios mínimos con bajo magnesio, fosfato y pH ácido, favorece la expresión de los genes de SPI-2, lo que sugiere que estos medios simulan el ambiente intravacuolar (Rhen & Dorman, 2005, Deiwick *et al.*, 1999).

Sin embargo, como ya se mencionó, en un trabajo de nuestro grupo de investigación se encontró que, al igual que los genes de SPI-1, los genes de SPI-2 también se expresan cuando *Salmonella* crece en LB. No obstante, mientras que los genes de SPI-1 se expresan principalmente en la fase temprana de crecimiento estacionario, los genes de SPI-2 lo hacen en la fase estacionaria tardía (Figura 7A) (Bustamante *et al.*, 2008). En estas condiciones de cultivo la expresión tanto de los genes de SPI-1 como los de SPI-2, es inducida por el regulador HilD, codificado en SPI-1 (Bustamante *et al.*, 2008). Cabe resaltar que la regulación de SPI-2 mediada por HilD, no ocurre en medio mínimo, en donde la expresión de estos genes depende de otros reguladores, entre ellos SlyA, OmpR y PhoP (Navarre *et al.*, 2006, Feng *et al.*, 2003).



**Figura 7.** Los genes pertenecientes a los regulones de SPI-1 y SPI-2 de *S. Typhimurium* son expresados en LB en diferente fase de crecimiento. En las cinéticas de expresión de las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* de genes pertenecientes al regulón de SPI-1 (*invF* y *sopB*) y de SPI-2 (*ssaG* y *pipB*), se observa que la expresión de los genes de SPI-1 se incrementa de la hora 3 a la hora 7 (fase estacionaria temprana), mientras que la expresión de los genes de SPI-2 se incrementa de la hora 5 a la 12 (fase estacionaria tardía) (A). La expresión del regulador central de SPI-1, HilA y la de los reguladores de SPI-2, SsrB y OmpR, también está regulada por fase de crecimiento. Western blot realizado usando lisados totales de muestras de cultivo en LB de una cepa de *S. Typhimurium* que contiene al gen cromosomal *hila* etiquetado con el epítipo FLAG. HilA-FLAG fue detectado usando el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ FLAG. OmpR y SsrB se detectaron con los anticuerpos policlonales  $\alpha$ OmpR y  $\alpha$ SsrB (B) Curva de crecimiento de *S. Typhimurium* en LB, que muestra las fases de crecimiento correspondientes. La densidad óptica se midió a una absorbancia de 600nm (C) (A y B tomados de Bustamante *et al.*, 2008).

Otro aspecto que se observó en ese estudio fue que en la fase tardía de crecimiento estacionario hay una disminución en la expresión del regulador central de SPI-1, HilA (Figura 7B), lo cual contrasta con el aumento en la expresión de los reguladores de SPI-2, SsrB y OmpR. Esto podría sugerir que en este punto cesa la inducción de los genes de SPI-1 o que existe un mecanismo molecular que reprime la expresión de los genes de SPI-1 cuando se induce la expresión de los genes de SPI-2.

Con base en los antecedentes de la expresión diferencial de los genes de SPI-1 y SPI-2 cuando *S. Typhimurium* crece en LB, en este trabajo nos planteamos como objetivo

central esclarecer cuáles son los mecanismos que controlan la regulación por fase de crecimiento de la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2. Específicamente, nos planteamos las siguientes preguntas:

1. ¿Qué es lo que provoca el aumento en la expresión de los genes de SPI-1 durante la fase estacionaria temprana?
2. ¿Por qué la expresión de los genes de SPI-1 disminuye al llegar a la fase estacionaria tardía?
3. ¿Por qué los genes de SPI-2 se expresan de manera desfasada de los genes de SPI-1, hasta la fase estacionaria tardía?



## **IV. Objetivos**

### **Objetivo general**

Determinar los mecanismos moleculares que regulan la expresión de los genes de virulencia en *Salmonella enterica* ser. Typhimurium.

### **Objetivo particular**

Investigar qué elementos determinan la regulación por fase de crecimiento de los genes de SPI-1 y SPI-2 durante el crecimiento en medio LB.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar la cinética de expresión de los genes que conforman la cascada reguladora que controla la expresión de los genes de SPI-1.
- Definir si OmpR o SsrB, reguladores de SPI-2, podrían ser los responsables de reprimir la expresión de los genes de SPI-1 durante la fase estacionaria tardía.
- Analizar la expresión a nivel transcripcional del operón *ssrAB* y la expresión de las proteínas SsrA y SsrB.

## V. Metodología

**Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo**

Cepa	Descripción	Referencia
<i>S. Typhimurium</i>		
WT	Cepa silvestre SL1344, Str <sup>R</sup>	Hoiseith, <i>et al.</i> , 1981
$\Delta sirA$	Derivada de $\Delta sirA::kan$ , Str <sup>R</sup> , Km <sup>S</sup>	Martínez, <i>et al.</i> , sometido
$\Delta ompR$	Derivada de $\Delta ompR::kan$ , Str <sup>R</sup> , Km <sup>S</sup>	Martínez, <i>et al.</i> , sometido
$\Delta barA::kan$	Derivada de SL1344, Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Martínez, <i>et al.</i> , sometido
$\Delta csrA::kan$	Derivada de SL1344, Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Martínez, <i>et al.</i> , sometido
$\Delta rpoS::kan$	Derivada de SL1344, Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Martínez, <i>et al.</i> , sometido
$\Delta lon::kan$	Derivada de SL1344, Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Martínez, <i>et al.</i> , sometido
$\Delta hilE::kan$	Derivada de SL1344, Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Martínez, <i>et al.</i> , sometido
$\Delta ssrB::kan$	Derivada de SL1344, Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Bustamante, <i>et al.</i> , 2008
$\Delta hns::kan$	Derivada de SL1344, Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Martínez, <i>et al.</i> , sometido
$\Delta relA\Delta spoT::kan$	Derivada de $\Delta relA::kan$ , Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Bustamante, <i>et al.</i> , 2008
$ssrB::3\times FLAG$	Derivada de SL1344, Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> ; expresa la proteína SsrB-FLAG	Martínez, <i>et al.</i> , sometido
$ssrA::3\times FLAG$	Derivada de SL1344, Str <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> ; expresa la proteína SsrA-FLAG	Bustamante, <i>et al.</i> , 2008
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	Cepa de laboratorio, Nal <sup>R</sup>	Invitrogen
DH10 $\beta$	Cepa de laboratorio, Str <sup>R</sup>	Invitrogen

**Tabla 5. Plásmidos utilizados en este trabajo**

Plásmido	Descripción	Referencia
pKK232-8	Derivado de pBR322, contiene el gen <i>cat</i> (cloranfenicol acetil transferasa) sin promotor, Amp <sup>R</sup>	Pharmacia LKB Biotechnology (Brosius, 1984)
philA-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión	Bustamante, <i>et al.</i> ,

	transcripcional <i>hilA-cat</i> , que lleva la región -410 a +466, con respecto al sitio de inicio de transcripción de <i>hilA</i> , Amp <sup>R</sup>	2008
philD-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilD-cat</i> , que lleva la región -364 a +88, con respecto al sitio de inicio de transcripción de <i>hilD</i> , Amp <sup>R</sup>	Bustamante, <i>et al.</i> , 2008
psirA-cat	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 traducción de <i>sirA</i> , Amp <sup>R</sup>	Bustamante, <i>et al.</i> , 2008
pcsrB-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrB-cat</i> , que lleva la región -372 a +18, con respecto al sitio de inicio de transcripción de <i>csrB</i> , Amp <sup>R</sup>	Martínez, <i>et al.</i> , sometido
pcsrC-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrC-cat</i> , que lleva la región región -351 a +63, con respecto al sitio de inicio de transcripción de <i>csrC</i> , Amp <sup>R</sup>	Martínez, <i>et al.</i> , sometido
pbarA-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>barA-cat</i> , que lleva la región -312 a +127, con respecto al sitio de inicio de traducción de <i>barA</i> , Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pinvF-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>invF-cat</i> , que lleva la región -306 a +231, con respecto al sitio de inicio de transcripción de <i>invF</i> , Amp <sup>R</sup>	Bustamante, <i>et al.</i> , 2008
philE-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hile-cat</i> , que lleva la región -910 a +70, con respecto al sitio de inicio de transcripción de <i>hile</i> , Amp <sup>R</sup>	De la Cruz, <i>et al.</i> ; no publicado

pcsrA-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrA-cat</i> , que lleva la región -327 a +61 con respecto al sitio de inicio de traducción de <i>csrA</i> , Amp <sup>R</sup>	Martínez, <i>et al.</i> , no publicado
pssrAB-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssrAB-cat</i> , que lleva la región -303 a +3054, con respecto al sitio de inicio de transcripción de <i>ssrAB</i> , Amp <sup>R</sup>	Bustamante, <i>et al.</i> , 2008
pssaG-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssaG-cat</i> , que lleva la región -232 a +361, con respecto al sitio de inicio de transcripción de <i>ssaG</i> , Amp <sup>R</sup>	Bustamante, <i>et al.</i> , 2008
pMPM-K3	Vector de clonación de bajo número de copias; origen P15A, Km <sup>R</sup>	Mayer, 1995
pK3SirA	Derivado de pMPM-K3, contiene el gen estructural <i>sirA</i> y el sitio de unión al ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> , Km <sup>R</sup>	Martínez, <i>et al.</i> , sometido
pMPM-T3	Vector de clonación de bajo número de copias; origen P15A, Tet <sup>R</sup>	Mayer, 1995
pT3SsrB	Derivado de pMPM-T3, contiene el gen estructural <i>ssrB</i> y el sitio de unión al ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> , Tet <sup>R</sup>	Martínez, <i>et al.</i> , no publicado
pT3SsrAB	Derivado de pMPM-T3, contiene el operón <i>ssrAB</i> y el sitio de unión al ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> , Tet <sup>R</sup>	De la Cruz, <i>et al.</i> , no publicado
pT3OmpR	Derivado de pMPM-T3, contiene el gen estructural <i>ompR</i> y el sitio de unión al ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> , Tet <sup>R</sup>	Bustamante, <i>et al.</i> , 2008
pT3HilD	Derivado de pMPM-T3, contiene el gen estructural <i>hilD</i> y el sitio de unión al ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> , Tet <sup>R</sup>	Bustamante, <i>et al.</i> , 2008

**Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en este trabajo**

Nombre	Secuencia	Tm	Modificación
Construcción de la fusión <i>barA-cat</i>			
barA-F	5'-GCA <u>GGA TCC</u> AAA ATG CGG GCA GCG C -3'	60	<i>Bam</i> HI
barA-R	5'-CGG <u>AAG CTT</u> CCA GTT CAG GCT GCA G -3'	60	<i>Hind</i> III
RT-PCR en tiempo real de <i>ssrA</i>			
ssrA-RT-F	5'-TCC TCT GAT ATC GAT GAA AAT AG-3'	62	-
ssrA-RT-R	5'-GGC TGT AGA GTT GAA TAA TCT G-3'	62	-
RT-PCR en tiempo real de <i>ssrB</i>			
ssrB-RT-F	5'-CTT ATC CTT GAT CTT AGT CTA C -3'	60	-
ssrB-RT-R	5'-GTC ATA TAC TCT TGT TGG TAT G-3'	60	-
RT-PCR en tiempo real de <i>ssaG</i>			
ssaG-RT-F	5'-GCA GGC CCA GGC CAT TAA TG -3'	60	-
ssaG-RT-R	5'- CAT TTT GAT CAG TGA ACT TTC G-3'	60	-
RT-PCR en tiempo real de <i>gyrA</i>			
gyrA-RT-F	5'-GTA TGG CGA CGA ATA TCC CG -3'	60	-
gyrA-RT-R	5'-GCC CCG GAA TAT GTT CCA TC -3'	60	-

**Tabla 7. Antibióticos y dosis empleadas**

Estreptomina (Str)	100 µg/ml
Ampicilina (Amp)	200 µg/ml
Kanamicina (Km)	20 µg/ml
Tetraciclina (Tet)	10 µg/ml

**Preparación de células electrocompetentes**

Las cepas de interés se cultivaron en 5 ml de LB adicionado con los antibióticos correspondientes (Tabla 7) y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al otro día, 2 ml de estos cultivos se emplearon para inocular un matraz de 250 ml con 100 ml de LB, adicionado con los mismos antibióticos. Los cultivos se incubaron por un periodo de 2 a 3

horas a 37°C en agitación a 200 rpm, hasta que alcanzaron una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.6 a 0.8. Posteriormente los cultivos se centrifugaron por 10 min a 7000 rpm a 4°C en tubos Nalgene. El sobrenadante se desechó, la pastilla se lavó con 30 ml de agua MQ fría estéril y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 30 ml de glicerol al 10% frío. Después de centrifugar otra vez, el sobrenadante se desechó y las células finalmente se resuspendieron en 200 a 400 µl de glicerol al 10%, de acuerdo al tamaño de la pastilla.

### **Electroporación**

Se mezclaron 40 µl de células electrocompetentes con 50-100 ng de DNA plasmídico o 5 µl de las ligaciones. Esta mezcla se colocó en una celda de electroporación fría (BIORAD) y se le dio un pulso eléctrico de 2.5 kV durante 5.5 ms usando el electroporador “*E. coli* pulser” (BIORAD). Posteriormente se agregó a la celda 1 ml de medio de cultivo SOC; esta mezcla se transfirió a un tubo de ensayo y se incubó durante una hora a 37°C en agitación a 200 rpm. Finalmente, se tomaron 250 µl del cultivo para sembrarse en cajas Petri con medio LB solidificado con agar al 1.5% con los antibióticos correspondientes (Tabla 7) y se incubaron a 37°C durante 16 horas aproximadamente.

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

#### *Medio Luria Bertani (LB)*

Las cepas que contienen los plásmidos que llevan las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* o aquellas que expresan proteínas etiquetadas con el epítoto FLAG (Tablas 4 y 5), se cultivaron en 5 ml de medio LB adicionado con los antibióticos (Tabla 7) para los que dichas cepas tienen resistencia y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente se tomaron 500 µl de cada uno de los cultivos para inocular cuatro matraces de 250 ml con 50 ml de LB, también adicionado con los antibióticos correspondientes. Estos cultivos se incubaron durante 9, 10 ó 12 h a 37°C en agitación a 200 rpm. Las muestras para analizar la expresión de las fusiones transcripcionales se tomaron durante cada hora de la cinética de crecimiento o a ciertas horas (por ejemplo sólo a las horas 2, 5 y 9), mientras que las muestras

para analizar la expresión de las proteínas etiquetadas con el epítoto FLAG se tomaron cada dos horas; en cada hora se midió la densidad óptica a 600 nm de los cultivos.

Para las muestras correspondientes a las horas 1 y 2 crecimiento, debido a la menor cantidad de bacterias en el medio, se tomó un volumen de 10 y 5 ml, respectivamente, ambas de dos de los 4 matraces inoculados. Para evitar que la disminución de volumen del cultivo afectara las muestras posteriores, a partir de la hora 3 se tomaron muestras de los dos matraces restantes. De la hora 3 a 7 se tomaron 1.5 ml de cultivo y para las horas posteriores se tomó 1 ml. En caso de que sólo se tomaran muestras a las 2, 5 y 9 horas se tomó el mismo volumen de muestra (5 ml a la hora 2, 1.5 ml a la hora 5 y 1 ml a la hora 9).

Todas las muestras se centrifugaron durante 2 min a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Las pastillas bacterianas que se iban a emplear para el análisis de las fusiones transcripcionales, se lavaron antes de almacenarse a -20°C. Para esto se resuspendieron en 800 µl de solución de lavado TDTT (Tris-HCl pH 7.8 50 mM, Dithiotreitol 30 µM), se centrifugaron durante 2 min a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante.

#### *Medio mínimo N (MM-N)*

Al igual que para las cinéticas de expresión en LB, las cepas que contienen los plásmidos que llevan las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* se cultivaron en 5 ml de medio LB adicionado con los antibióticos para los que tienen resistencia (Tabla 7) y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente se hicieron dos pastillas centrifugando 2.5 ml de los cultivos y se les dio un lavado con 1 ml de MM-N. Se inocularon dos matraces con 50 ml de MM-N adicionado con los antibióticos correspondientes, cada uno con una de las pastillas resuspendida en 1 ml de MM-N.

Los cultivos se incubaron durante 16 h a 37°C en agitación a 200 rpm, hora a la cual se tomó una muestra de 1.5 ml, también midiéndose la densidad óptica de los cultivos a 600 nm. Las muestras se centrifugaron durante 2 min y se desechó el sobrenadante. Las pastillas obtenidas, se lavaron con 800 µl de solución de lavado TDTT y posteriormente fueron almacenadas a -20°C.

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

Las pastillas bacterianas conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  fueron resuspendidas en un volumen variable de TDTT (de 100 a 900  $\mu\text{l}$ , dependiendo del tamaño de la pastilla). Posteriormente, fueron sonicadas durante 3 min en un sonicador “Vibra Cell”, con pulsos de una duración de 9.9 s y periodos de reposo también de 9.9 s entre cada pulso (tiempo total de sonicación, 6 min). Las muestras sonicadas fueron centrifugadas durante 15 min a 13,000 rpm y el sobrenadante fue transferido a tubos nuevos.

Para cuantificar las proteínas totales contenidas en el sobrenadante se utilizaron placas de cultivo celular de 96 pozos (Costar), depositándose por duplicado 10  $\mu\text{l}$  de cada muestra por pozo. En el pozo correspondiente al blanco se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de TDTT. Posteriormente, a cada pozo se le agregaron 200  $\mu\text{l}$  de una mezcla de los reactivos del estuche BCA “Protein Assay Reagent” (Pierce) y la placa se incubó durante 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido este tiempo, la concentración de proteínas se calculó mediante la lectura de la absorbancia a 562 nm en un lector automatizado de microplacas tipo CERES 900 C (Bio-Tek Instruments Inc.), empleando el programa KC3. Los valores obtenidos se interpolaron en una curva estándar de concentraciones de la proteína BSA (albúmina de suero de bovino) previamente almacenada en dicho programa. Cuando el valor de proteínas totales del extracto fue mayor a 0.4 unidades se hicieron diluciones de las proteínas totales usando TDTT, procurando que la concentración final quedara entre 0.2 y 0.4 unidades.

Para calcular la actividad enzimática de CAT, se depositaron por duplicado 5  $\mu\text{l}$  de cada extracto (o dilución si era el caso), en otra placa de cultivo celular de 96 pozos. Posteriormente se agregaron a cada pozo 200  $\mu\text{l}$  de una mezcla que contiene Tris-HCl pH 7.8 0.1M, DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico), Research Organics, Inc.) 1 mM, cloranfenicol 0.1 mM (Sigma) y acetil Co-A 0.1 mM (Pharmacia Biotech). Inmediatamente después se obtuvo, en el mismo lector para microplacas posicionado en el modo de cinética, la actividad de CAT mediante la lectura de la absorbancia a 410 nm en intervalos de 5 s durante 5 min. Los valores de actividad obtenidos de cada muestra se interpolaron en una curva estándar de actividad de CAT (de 0 a 2500 unidades/ml), previamente almacenada en el programa KC3.

La actividad específica de CAT ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) se obtuvo al dividir las unidades de actividad de CAT entre la concentración total de proteínas de cada extracto. En los casos en los



que se hicieron diluciones de las proteínas totales, se multiplicó el valor obtenido por el factor de dilución correspondiente.

### **Western blot para detectar proteínas etiquetadas con el epítoto FLAG**

Las pastillas obtenidas de los cultivos se resuspendieron en 200 a 500  $\mu$ l de buffer de carga SDS-PAGE1X (según el tamaño de la pastilla), se calentaron a 92°C durante 5 min y se visualizó el extracto de proteínas totales en un gel de poliacrilamida al 12% para ajustar la concentración de las muestras.

Muestras de los extractos ajustados a una concentración similar se sometieron a electroforesis en gels de poliacrilamida al 10, 12 ó 15% (dependiendo del tamaño de la proteína que se quiso detectar). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Para esto, se recortaron 6 cuadros de papel filtro (Whatman) y un cuadro de membrana de nitrocelulosa (Millipore) del tamaño del gel. El gel y la membrana fueron colocados en buffer de transferencia (Ver apéndice) durante 10 min. Los cuadros de papel filtro se humedecieron en el mismo buffer antes de realizar la transferencia semi-húmeda. Para transferir el gel, se sobrepuso todo en una cámara de transferencia (BIORAD) previamente humedecida, en el siguiente orden: 3 cuadros de papel filtro, la membrana de nitrocelulosa, el gel de poliacrilamida y 3 cuadros de papel filtro. Se dejó transfiriendo durante 60 min a 15 V.

Una vez terminada la transferencia, la membrana se colocó en solución bloqueadora (Ver apéndice) y se mantuvo en agitación durante toda la noche. Al día siguiente, se retiró la solución bloqueadora, se agregó PBS-T (Ver apéndice) que contenía el anticuerpo primario (anti-FLAG 1:2000 (Sigma) o anti-DNAK 1:20000 (StressGen)) y se dejó en agitación durante 4 horas.

Después de retirar el anticuerpo primario se dieron 3 lavados en agitación durante 10 minutos con PBS-T. Posteriormente se agregó PBS-T que contenía el anticuerpo secundario (anti-ratón 1:10000 (PIERCE)) y la membrana se dejó en agitación.

Transcurrida una hora se dieron nuevamente tres lavados de 10 min con PBS-T y se agregaron los reactivos “Enhanced Luminol Reagent” y “Oxidizing Reagent”, del kit para revelado Perkin Elmer Life Sciences en proporción 1:1, manteniéndose en agitación durante 1 min.

Para el revelado, la membrana se colocó entre dos acetatos en un cassette para revelado (KODAK) y se expuso a una película para revelado (KODAK Scientific Imaging film) por un

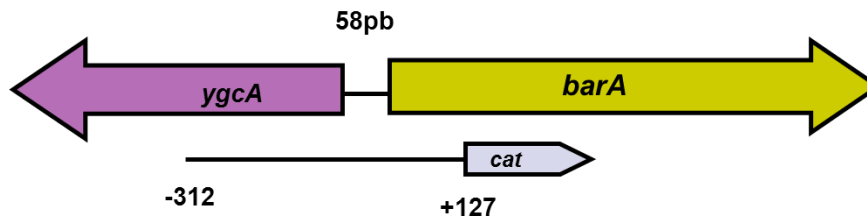
periodo de 30 s a 7 min, dependiendo de la intensidad de la señal. Una vez expuesta, la película se colocó en solución reveladora (KODAK GBX developer) durante 2 min, se enjuagó con agua y se colocó en solución fijadora (KODAK GBX fixer) por 30 s.

### **Construcción del plásmido que contiene la fusión transcripcional *barA-cat***

Empleando oligonucleótidos específicos que contienen los sitios de restricción necesarios (Tabla 6), se amplificó la región reguladora del gen *barA* mediante PCR (Reacción de la polimerasa en cadena). En la figura 8 se esquematiza la región que fue amplificada y empleada para la construcción de la fusión. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE (Tris-Acetato-EDTA 0.5X, pH 8.0) a 80 V. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 µl/mg) y visualizado en un transiluminador de luz UV de onda corta (Sigma), que permitiera identificar la banda del tamaño correspondiente a la región amplificada para cortarla y purificarla mediante el kit “AxyPrep DNA gel extraction kit” (Axygen). Posteriormente el fragmento y el plásmido pKK232-8 (que contiene al gen reportero *cat* sin promotor, ver tabla 4) fueron digeridos con las enzimas de restricción *Hind*III y *Bam*HI. Las digestiones dobles fueron purificadas mediante el kit “AxyPrep PCR cleanup kit” (Axygen) y se visualizaron en un gel de agarosa al 1%. De acuerdo a las cantidades observadas en éste, el producto de PCR y el vector pKK232-8 se ligaron poniéndolos en la reacción de ligación en una proporción aproximada de 5:1 molar. La reacción se incubó a 16°C toda la noche; al día siguiente la ligación se precipitó usando glicógeno y se emplearon 5 µl para transformar la cepa *E. coli* DH10β.

Para confirmar que la clonación del fragmento de *barA* en el plásmido pKK232-8 se llevó a cabo, se purificaron plásmidos de varias transformantes de *E. coli* DH10β mediante miniprep, mismos que fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%. Aquellos plásmidos que contenían un inserto, fueron digeridos empleando las mismas enzimas con las que se clonó para corroborar el tamaño del inserto. Se seleccionaron los plásmidos que tuvieran el inserto correcto y se purificaron con el estuche “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche). Finalmente se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM para obtener y verificar la secuencia de nucleótidos.

De esta manera se obtuvo el plásmido pbarA-cat que contiene la fusión transcripcional del gen *barA* al gen reportero *cat* (Tabla 5).



**Figura 8.** Esquema que muestra las posiciones que abarca la región contenida en la fusión transcripcional *barA-cat*, con respecto al inicio de la traducción de *barA*.

### Precipitación de ligaciones

A las reacciones de ligación, después de mantenerse a 16°C durante toda la noche, se les agregó 1 µl de glicógeno (20 mg/ml) (Roche) y 500 µl de etanol absoluto y se incubaron durante 30 min a -20°C. Posteriormente se centrifugaron 15 min a 14000 rpm, decantándose el sobrenadante al final. Se agregaron 700 µl de etanol al 70% y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, desechando nuevamente el sobrenadante. Los tubos se secaron en Speedvac sc100 (Savant) y se resuspendieron en 10 µl de agua MQ.

### Purificación de plásmidos

Las cepas que contienen los plásmidos de interés se cultivaron en 5 ml de LB adicionado con los antibióticos adecuados (Tabla 5); incubándolos durante toda la noche a 37°C con agitación a 200rpm.

Los 5 ml de los cultivos se concentraron, centrifugando consecutivamente 2 min a 14000 rpm y desechando el sobrenadante. Las pastillas se resuspendieron en 150 µl de buffer SET. Posteriormente se les agregaron 8 µl de RNAsa (10 mg/ml) y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Transcurrido este tiempo se les agregaron 400 µl de solución de lisis (NaOH 0.2 M, SDS 1%) y se incubaron en hielo. Después de 5 min, se les agregaron 300 µl de acetato de amonio 7.5M pH 7.8 y se incubaron en hielo durante 10 min, para posteriormente centrifugarlas durante 10 min a 14000 rpm. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se agregaron 500 µl de isopropanol. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y después de centrifugó a 14000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue desechado y se agregó

1 ml de etanol al 70%. Posteriormente se centrifugó durante 10 min a 14000 rpm, el sobrenadante fue desechado y las pastillas se secaron completamente, para finalmente resuspenderlas en 50-100 µl de agua.

### **Purificación de RNA total para ensayos de RT-PCR en tiempo real**

La cepa silvestre de *S. Typhimurium* se cultivó en 5 ml de medio LB (Luria Bertani) adicionado con los antibióticos para los que tiene resistencia (Tabla 7), incubándose a 37°C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente se tomaron 500 µl del cultivo para inocular dos matraces de 250 ml con 50 ml de LB, también adicionado con los antibióticos correspondientes. Estos cultivos se incubaron durante 9 horas a 37°C en agitación a 200 rpm. Las muestras para extraer RNA se tomaron en condiciones de esterilidad a las 2, 5 y 9 horas de crecimiento. En la hora 2, dada la menor cantidad de bacterias en el medio, se tomaron muestras de 5 ml. A la hora 5 se tomaron 1.5 ml y en la hora 9 se tomó 1 ml. Asimismo, en dichas horas se midió la densidad óptica de los cultivos a 600 nm.

Las pastillas obtenidas luego de centrifugar las muestras, fueron lavadas una vez con 800 µl de PBS 1X estéril y se almacenaron a -20°C.

Las pastillas de bacterias se resuspendieron en 20 µl de H<sub>2</sub>O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) 0.1% v/v. Posteriormente, se adicionaron 3 µl de H<sub>2</sub>O DEPC al 0.5% v/v y 200 µl de acetona helada. Se mezclaron los componentes con pipeta y se centrifugó durante 2 min a 10,000 rpm, desechándose el sobrenadante al final. La pastilla se resuspendió en 30 µl de H<sub>2</sub>O DEPC al 0.1% v/v, se agregaron 10 µl de lisozima (preparada al momento con H<sub>2</sub>O DEPC al 0.1% v/v) y se incubó a 37°C. Transcurridos 10 min se agregó 1 µl de proteinasa K (100 µg/ml) y se incubó en hielo por otros 10 min.

Posteriormente se agregaron 3.5 µl de H<sub>2</sub>O DEPC al 0.5% v/v, 200 µl de fenol precalentado a 70°C y 150 µl de cloroformo. Los componentes se mezclaron con pipeta, se agregaron 120 µl de H<sub>2</sub>O DEPC al 0.1% v/v y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 3.5 µl de H<sub>2</sub>O DEPC al 0.5% v/v, 200 µl de fenol precalentado a 70°C, 150 µl de cloroformo y 120 µl de H<sub>2</sub>O DEPC al 0.1% v/v. La mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. Posteriormente se volvió a tomar la fase acuosa para transferirla a un tubo nuevo y se le agregó 1 ml de etanol absoluto. Después de precipitar las

muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante al menos una hora, se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15min, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC al 0.1% V/V.

Posteriormente, para limpiar la muestra de rastros de DNA, se realizó un tratamiento con DNAsa durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción se paró agregando 2 $\mu\text{l}$  de EDTA 25  $\mu\text{M}$  e incubando a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10min. Para verificar que el DNA hubiera sido eliminado por completo, se realizó una PCR usando los oligos diseñados para la PCR en tiempo real. Si resultó que la muestra aún contenía DNA, es decir, se amplificaba un fragmento de DNA, se repitió el tratamiento con DNAsa. El proceso se repitió hasta que las muestras quedaran libres de DNA, usando la PCR como indicador. De las muestras ya libres de DNA, se cuantificó la concentración de RNA y las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Cuantificación de RNA total**

Para cuantificar la cantidad total de RNA purificado se diluyeron 10  $\mu\text{l}$  del RNA en 490  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC al 0.1% v/v y se depositó la mezcla en celdas de cuarzo (Sigma) previamente lavadas por 10 min con solución NaOH 0.1 M EDTA 1 mM. Se midió la densidad óptica de las celdas a una absorbancia de 260 nm y la concentración de RNA se calculó considerando una unidad de  $A_{260}$  como 40  $\mu\text{l/ml}$  de RNA. Para obtener la concentración final de RNA se multiplicó lo obtenido por el factor de dilución (50 en este caso).

### **Ensayos de RT-PCR**

La detección de los genes *ssrA*, *ssrB* y *ssaG* por RT-PCR se realizó como se describe a continuación.

Primero se sintetizó el DNA complementario (cDNA) de estos genes, usando RNA total y los oligos *ssrA*-RT-R, *ssrB*-RT-R y *ssaG*-RT-R. Como control interno para normalizar los resultados se usó el gen *gyrA*, por lo tanto también se obtuvo su cDNA usando el oligo *gyrA*-RT-R, específico para este gen. El cDNA se obtuvo usando el kit “RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit” (Fermentas). Para esto, en un tubo se mezclaron 0.5  $\mu\text{g}$  de RNA total y 1  $\mu\text{l}$  de cada uno de los oligos. La reacción se llevó a

12 µl con H<sub>2</sub>O DEPC al 0.1% v/v, se incubó 5 min a 70°C y se enfrió en hielo. Posteriormente se agregaron 4 µl de la solución buffer, 1 µl de inhibidor de RNAasa (20 U) y 2 µl de dNTPs (a una concentración de 10 mM). Después de un periodo de incubación de 5 min a 37°C, se agregó 1 µl de la enzima transcriptasa reversa (200 U), lo que llevó la reacción a 20 µl totales. Se incubó una hora a 42°C, después se detuvieron las reacciones incubándolas a 70°C durante 10 min y se enfriaron en hielo antes de almacenarlas a -20°C.

Para el PCR en tiempo real se prepararon reacciones por triplicado para cada gen y de cada hora. Las reacciones contenían: 10 µl de SYBR Green PCR Master Mix (Perkin-Elmer/Applied Bio-systems), 7 µl de H<sub>2</sub>O DEPC al 0.1% v/v, 1 µl de la reacción de síntesis de cDNA y 1 µl de los oligos (forward y reverse) para amplificar cada gen (*ssrA*-RT-R y *ssrA*-RT-F para *ssrA*, *ssrB*-RT-R y *ssrB*-RT-F para *ssrB*, *ssaG*-RT-R y *ssaG*-RT-F para *ssaG* y *gyrA*-RT-R y *gyrA*-RT-R para *gyrA*).

Las reacciones de RT-PCR fueron realizadas en el ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Bio-systems) en el modo estándar y usando el programa Rotor Gene 6000 1.7. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 10 min a 95°C y 40 ciclos de 95°C por 15 s y 60°C por 60 s. Para la cuantificación de los productos de la PCR en tiempo real se empleó el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  reportado por Livak and Shmittgen (2001). Todas las reacciones de RT-PCR fueron realizadas por triplicado y se realizaron a partir de 3 diferentes cultivos bacterianos.

## VI. Resultados

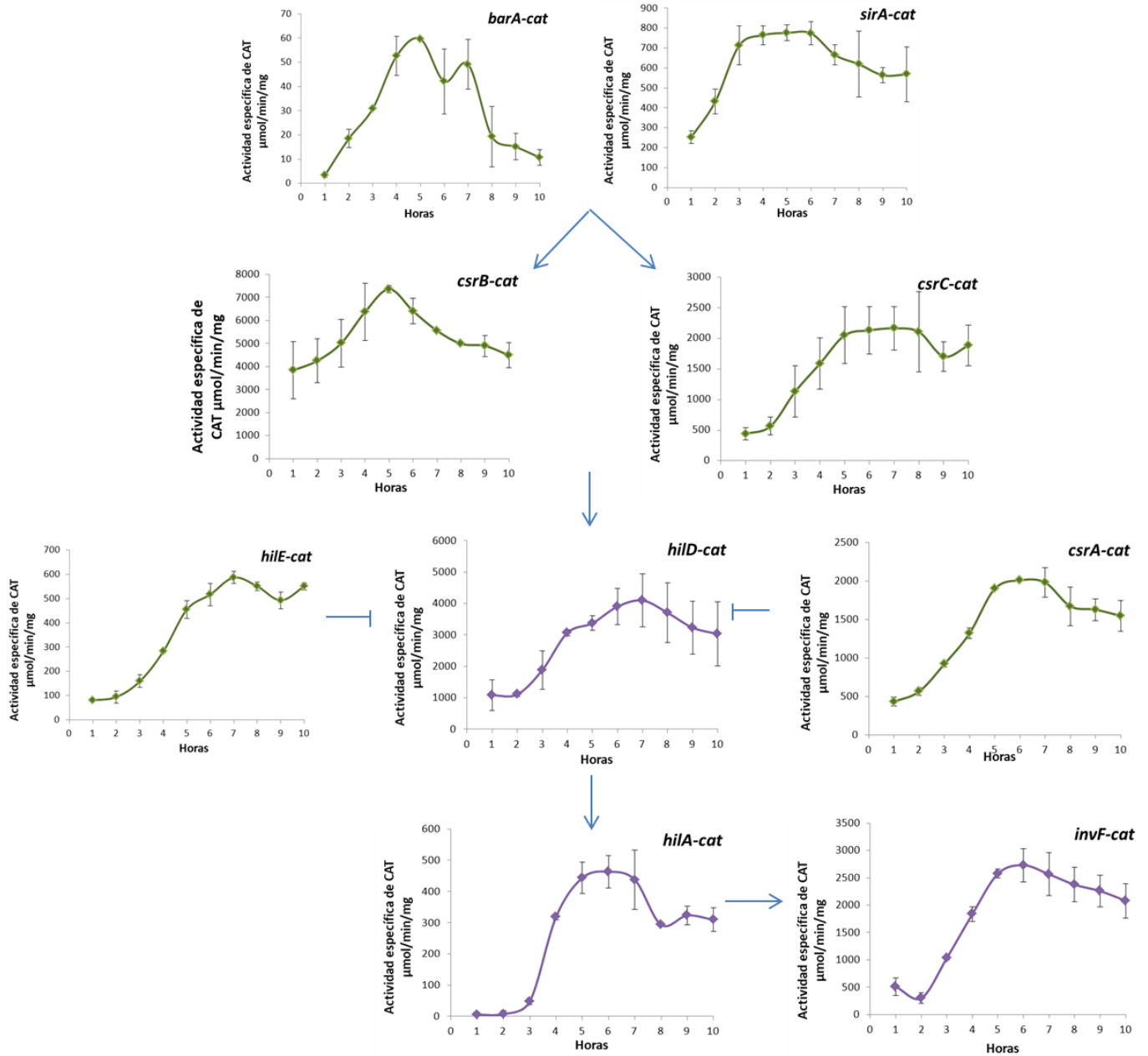
### Los genes que conforman la cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 presentan un patrón similar de regulación por fase de crecimiento

Previamente habíamos analizado las cinéticas de expresión de los genes del regulón de SPI-1 *hilA*, *invF* y *sopB*, encontrando que éstos se expresan durante la fase del crecimiento estacionaria temprana de *Salmonella* en LB (Figura 7) (Bustamante *et al.*, 2008). Por otro lado, en nuestro grupo hemos definido también que estos tres genes se encuentran al final de una cascada de regulación que controla la expresión del regulón SPI-1, la cual involucra a los reguladores BarA/SirA, CsrA, CsrB/C e HilE (Martínez *et al.*, sometido, Ellemeier & Slauch, 2007). Para definir si el patrón de expresión de los genes del regulón de SPI-1 se debe a la regulación por fase de crecimiento de los genes que están al inicio de dicha cascada de regulación, determinamos las cinéticas de expresión de los genes *sirA*, *barA*, *csrB*, *csrC*, *csrA*, *hilD*, *hilE*, *hilA* e *invF*. Para monitorear la expresión de estos genes usamos fusiones transcripcionales de sus regiones reguladoras al gen reportero *cat*. En el laboratorio se tenían los plásmidos *psirA-cat*, *pcsrA-cat*, *pcsrB-cat*, *pcsrC-cat*, *philD-cat*, *phile-cat*, *philA-cat* y *pinvF-cat*, que contienen las fusiones transcripcionales *sirA-cat*, *csrA-cat*, *csrB-cat*, *csrC-cat*, *hilD-cat*, *hilE-cat*, *hilA-cat* e *invF-cat*, respectivamente (Tabla 5); sin embargo, no se contaba con la fusión *barA-cat*. Para obtener esta fusión, amplificamos por PCR la región reguladora de *barA* y la clonamos en el vector pKK232-8, que contiene el gen *cat* sin promotor, generando así el plásmido *pbarA-cat*, que lleva la fusión *barA-cat* (Figura 8). Los plásmidos que contienen las diferentes fusiones se transformaron en *S. Typhimurium* SL1344 (WT) y se determinó la actividad específica de CAT de las transformantes a partir de muestras de cultivos tomadas cada hora durante un periodo de 10 horas de crecimiento en LB.

La figura 9 muestra que la cinética de expresión de todos los genes que conforman la cascada reguladora, desde *barA* hasta *invF*, aumenta a partir de la hora 2 ó 3 de crecimiento, alcanzando el valor más alto alrededor de la hora 5 ó 6. Después de este punto la expresión disminuye gradualmente. La similitud en el patrón de expresión de estos genes es más evidente en las figuras 10A, 10B y 10D, en las que se representa la actividad de

cada fusión como porcentaje de expresión, siendo el 100% el valor máximo de su expresión mostrado en la figura 9. Al analizar con más detalle las cinéticas de expresión en las primeras 4 horas, se puede ver que la inducción en la expresión *sirA*, *csrB*, *hild* e *hila* parece ser secuencial (Figura 10C), lo cual concuerda con la cascada de regulación en la que SirA induce la expresión de CsrB, el cual induce la expresión de Hild, que, a su vez, induce la expresión de HilA (Martínez *et al.*, sometido).

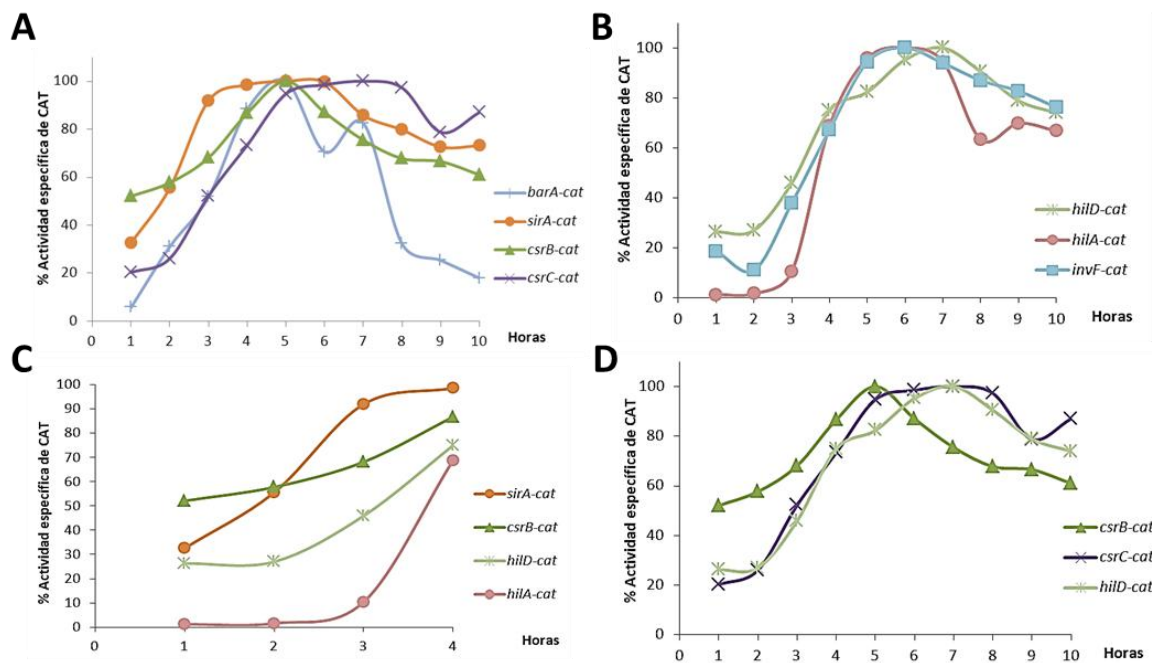




**Figura 9.** Cinéticas de expresión de los genes involucrados en el control de la expresión del regulón SPI-1. En verde se muestran los genes que se encuentran localizados fuera de islas de patogenicidad y en morado los que se encuentran codificados dentro de SPI-1. El orden de las cinéticas refleja la manera en que, se propone, ocurre la cascada de activación. Las cinéticas se obtuvieron analizando las fusiones transcripcionales de la región reguladora de cada gen al gen reportero *cat* en la cepa silvestre de *Salmonella*. La actividad específica de la enzima CAT se cuantificó a partir de muestras tomadas de cultivos crecidos en LB cada hora durante 10 horas. Los resultados mostrados representan el promedio de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

Una observación interesante a partir de estos resultados es que la expresión de los genes *hile* y *csrA* (Figura 9), que codifican para represores de *hilD* a nivel postranscripcional, se induce de manera similar que la de los genes de SPI-1 (Figura 10B), lo cual podría sugerir que el papel de HileE y CsrA podría ser el de mantener una concentración adecuada de HilD pero no reprimir por completo su expresión.

En conjunto, estos resultados muestran que los genes evaluados que conforman la cascada reguladora que controla la expresión del regulón de SPI-1 presentan un patrón de expresión similar entre sí. Esto sugiere que su regulación por fase de crecimiento podría ser consecuencia de la relación que guardan entre ellos en dicha cascada de regulación.

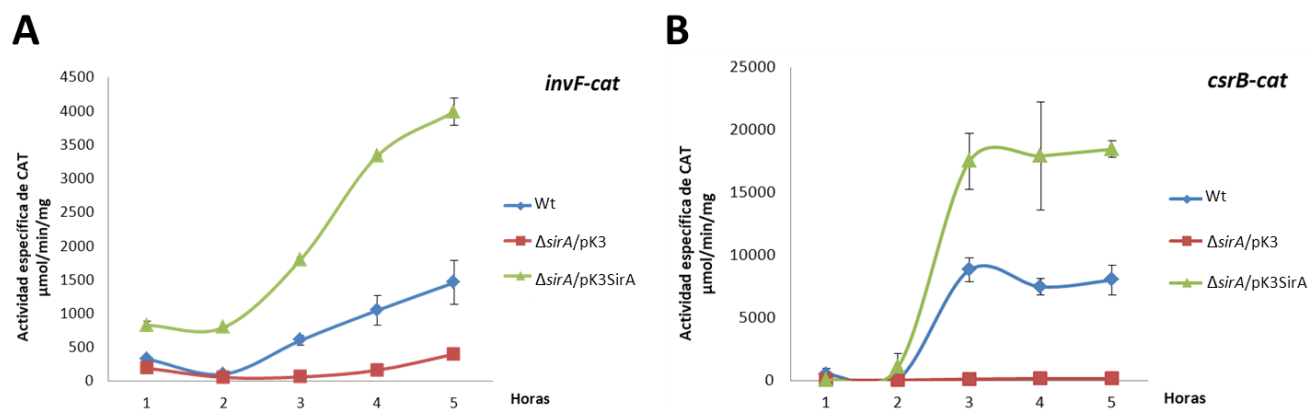


**Figura 10.** Los genes involucrados en la cascada de activación de SPI-1 tienen una regulación por fase de crecimiento similar, observable en las cinéticas de expresión de las fusiones *barA-cat*, *sirA-cat*, *csrB-cat*, *csrC-cat*, genes que se encuentran fuera de SPI-1(A) y en las de *hilD-cat*, *hilA-cat* e *invF-cat*, genes codificados en dicha isla (B). Activación secuencial de *sirA-cat* a *hilA-cat*, durante las primeras cuatro horas de crecimiento (C). El aumento en la expresión de los RNAs pequeños *csrB* y *csrC* permitiría la expresión de *hilD*, al quitar la represión mediada por CsrA (D). Las cinéticas muestran el porcentaje de actividad específica de CAT, tomando como 100% el valor más alto obtenido en la cinética de cada gen. Los datos empleados para la generación de estas gráficas son los mismos de las gráficas de la figura 9.

## La sobre-expresión de SirA, el regulador que se encuentra al inicio de la cascada reguladora de SPI-1, no altera el patrón de expresión dependiente de fase de crecimiento de los genes que se encuentran por debajo en la cascada

Dado que la expresión máxima del gen que codifica para el regulador de respuesta SirA se observa hasta la tercera hora de cultivo, podría ser que el patrón de expresión de los genes corriente abajo de SirA en la cascada reguladora dependa de que dicho regulador alcance la concentración crítica para iniciar la activación del resto los genes de la cascada, es decir, que estos genes no se expresen desde el inicio del crecimiento en LB por la falta de SirA. Para investigar esto, analizamos la expresión de la fusión *invF-cat* durante las primeras horas de crecimiento, en presencia del plásmido pK3SirA, que sobre-expresa constitutivamente a SirA. Esto se hizo con el propósito de tener una gran cantidad de proteína durante todo el crecimiento de *Samonella*. Asimismo, para que la única fuente de SirA fuera el plásmido y no la copia cromosómica del gen *sirA*, este análisis se llevó a cabo en la mutante  $\Delta sirA$  de *S. Typhimurium*.

Como muestra la figura 11A, la expresión de *invF-cat* disminuye alrededor de tres veces como máximo en la mutante  $\Delta sirA$  en comparación con su expresión en la cepa silvestre. La presencia del plásmido pK3SirA complementa la expresión de esta fusión en la mutante  $\Delta sirA$ , incluso a niveles mayores que en la cepa silvestre. Sin embargo, no modifica su patrón de regulación por fase de crecimiento, ya que la expresión de *invF-cat* se sigue induciendo, al igual que en la cepa silvestre, a partir de la hora 2 de crecimiento.



**Figura 11.** La sobre-expresión del regulador de respuesta SirA no modifica la regulación por fase de crecimiento de *invF* (A) o *csrB* (B). La expresión de las fusiones *invF-cat* y *csrB-cat*, contenidas en los

plásmidos *pinvF-cat* y *pcsrB-cat* respectivamente, fue analizada en la cepa silvestre de *Salmonella* y en su derivada mutante  $\Delta sirA$  que contiene o no el plásmido pK3SirA, que sobre-expresa a SirA. La actividad específica de CAT se cuantificó a partir de muestras tomadas cada hora durante las primeras 5 horas de crecimiento en LB. Los resultados mostrados representan el promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

Considerando que la activación de *invF* es una de las últimas etapas de la cascada de regulación para SPI-1, podría ser que la expresión constitutiva de SirA no tenga un efecto notorio en su expresión en las primeras horas de crecimiento por la existencia de puntos adicionales de regulación que actúan sobre los genes de la cascada que se encuentran entre *sirA* e *invF*. Para explorar esta posibilidad y dado que la expresión de *csrB* está directamente regulada por SirA (Martínez *et al.*, sometido), se analizó ahora la expresión de la fusión *csrB-cat* en los mismos fondos genéticos en los que analizamos la expresión de la fusión *invF-cat*.

De manera similar a lo observado con la fusión *invF-cat*, la presencia del plásmido pK3SirA llevó la expresión de la fusión *csrB-cat* en la mutante  $\Delta sirA$  a niveles mayores que los de la cepa silvestre, pero su inducción se dio a partir de la hora 2 de crecimiento, lo que también ocurre en la cepa silvestre. Esto indica que la expresión constitutiva de SirA tampoco modifica la regulación por fase de crecimiento de *csrB*.

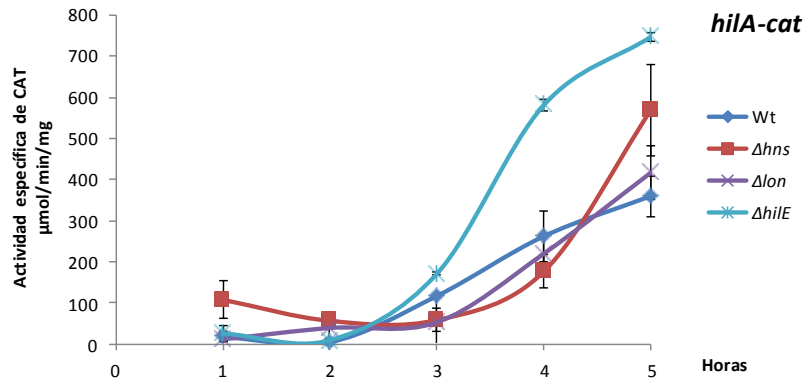
Estos resultados podrían indicar que aún cuando SirA se exprese constitutivamente, no será capaz de activar a sus genes blanco hasta que sea fosforilada en respuesta a una señal ambiental, muy probablemente mediante BarA. Dicha señal se produciría alrededor de la hora 2 del crecimiento de *S. Typhimurium* en LB e induciría la expresión de los genes de SPI-1 a través de SirA, lo cual determinaría su regulación por fase de crecimiento. Alternativamente, o en combinación con lo anterior, otro regulador podría ser el responsable de que la expresión de los genes de SPI-1, mediada por la cascada de regulación que inicia el sistema BarA/SirA, se dé específicamente en la fase temprana de crecimiento estacionario.

## **HilE, Lon y H-NS no reprimen la expresión de los genes de SPI-1 en la fase de crecimiento exponencial**

Una explicación posible para la expresión específica de los genes de SPI-1 en la fase temprana de crecimiento estacionario, es que algún regulador mantenga reprimida su expresión en la fase de crecimiento exponencial. HilE, Lon y H-NS son algunos de los reguladores negativos que se han descrito para los genes de SPI-1 (Boddicker & Jones, 2004, Baxter *et al.*, 2003, Olekhnovich & Kadner, 2007, Schechter & Lee, 2001). Los primeros dos actúan regulando postraduccionalmente a HilD. HilE se une a HilD, previniendo que induzca la expresión de *hilA* (Jones, 2005), mientras que la proteasa Lon degrada a HilD (Takaya *et al.*, 2005).

Para investigar si estos represores están involucrados en la regulación por fase de crecimiento del regulón de SPI-1, analizamos la expresión de la fusión *hilA-cat* en las mutantes  $\Delta hilE$  y  $\Delta lon$ , así como en una mutante que carece del dominio carboxilo terminal de H-NS ( $\Delta hns$ ), sin el cual esta proteína no es capaz de unirse al DNA y por lo tanto de ejercer su función represora (Sette *et al.*, 2009).

Como se muestra en la figura 12, la expresión de la fusión *hilA-cat* se indujo de manera similar en la fase estacionaria temprana, en la cepa silvestre y en sus derivadas mutantes  $\Delta hilE$ ,  $\Delta lon$  y  $\Delta hns$ . En la mutante  $\Delta hilE$  su expresión se incrementó significativamente con respecto a la cepa silvestre y en la mutante  $\Delta hns$  también aumentó a la hora 5 de crecimiento. Sin embargo, al igual que en la cepa silvestre, la expresión de la fusión *hilA-cat* permaneció reprimida en las primeras 2 horas del crecimiento en las tres mutantes. Estos resultados indican que los reguladores HilE, Lon y H-NS no son responsables de una probable represión de los genes de SPI-1 durante la fase de crecimiento exponencial.



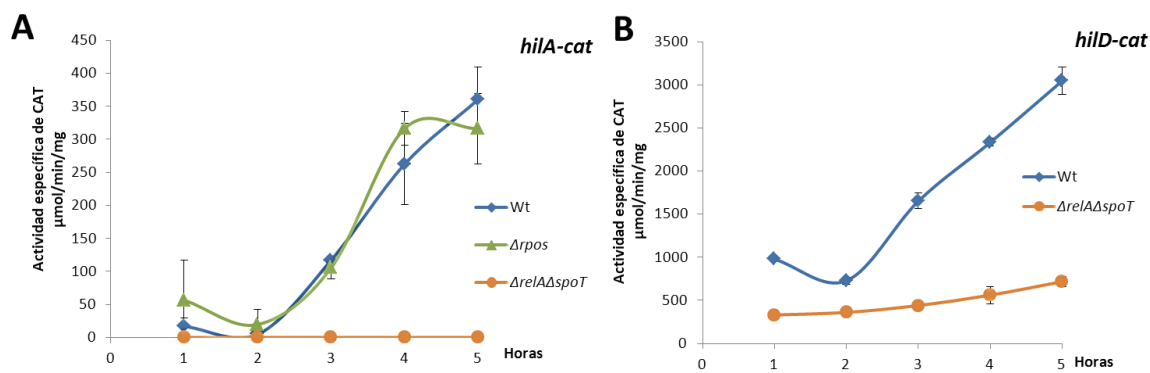
**Figura 12.** Los reguladores negativos H-NS, HilE y Lon no están involucrados en la represión temprana de los genes de SPI-1. Análisis de la expresión de *hilA* durante las primeras 5 horas de crecimiento en LB. La expresión de la fusión transcripcional *hilA-cat*, contenida en el plásmido *philA-cat*, se analizó en la cepa silvestre y en sus derivadas mutantes  $\Delta hns$ ,  $\Delta lon$  y  $\Delta hilE$ . La actividad específica de CAT se cuantificó a partir de muestras tomadas cada hora durante las primeras 5 horas de crecimiento en LB. Los valores mostrados equivalen a un promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

### La inducción de la expresión de los genes de SPI-1 en la fase estacionaria temprana parece ser controlada por la respuesta a la escasez de nutrientes mediada por ppGpp

Otra posibilidad que podría explicar la expresión de los genes de SPI-1 en la fase temprana de crecimiento estacionario, es que algún regulador positivo adicional se involucre en la cascada de regulación para estos genes, específicamente en esta fase del crecimiento. RpoS es un factor sigma involucrado en la expresión de genes cuando la bacteria alcanza la fase de crecimiento estacionaria (Dong & Schellhorn, 2010). RelA y SpoT son dos enzimas responsables de la síntesis de ppGpp (Guanosina tetrafosfato), una molécula que es producida en condiciones limitantes de nutrientes, como las que se presentan en la fase de crecimiento estacionaria (Song *et al.*, 2004).

Para investigar si el factor sigma RpoS o la molécula ppGpp están involucrados en la regulación por fase de crecimiento del regulón de SPI-1, analizamos la expresión de la fusión *hilA-cat* en la mutante  $\Delta rpoS$  y en la doble mutante  $\Delta relA\Delta spoT$ .

Como se muestra en la figura 13A, la expresión de la fusión *hila-cat* se abatió por completo en la doble mutante  $\Delta relA\Delta spoT$ . En contraste, su cinética de expresión no se afectó en la mutante  $\Delta rpoS$ , con respecto a la cepa silvestre.



**Figura 13.** La inducción de los genes de SPI-1 durante la fase estacionaria temprana es dependiente del factor de respuesta a escasez de nutrientes, ppGpp. Análisis de la expresión de *hila* (A) e *hilD* (B) durante las primeras 5 horas de crecimiento en LB. La expresión de las fusiones transcripcionales *hila-cat* y *hilD-cat* contenidas en los plásmidos *philA-cat* y *philD-cat*, respectivamente, se analizaron en la cepa silvestre y en sus derivadas mutantes  $\Delta rpoS$  y  $\Delta relA\Delta spoT$ . La actividad específica de CAT se cuantificó a partir de muestras tomadas cada hora durante las primeras 5 horas de crecimiento en LB. Los valores mostrados equivalen a un promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

Para confirmar estos resultados y definir si la ausencia de la molécula ppGpp en la mutante  $\Delta relA\Delta spoT$  afecta únicamente la expresión de *hila*, o también afecta la expresión de HilD, el regulador positivo de *hila*, analizamos la expresión de la fusión *hilD-cat* en la mutante  $\Delta relA\Delta spoT$ .

Al igual que lo observado para la fusión *hila-cat*, la expresión de la fusión *hilD-cat* disminuyó drásticamente en la mutante  $\Delta relA\Delta spoT$ , en comparación con su expresión en la cepa silvestre (Figura 13B).

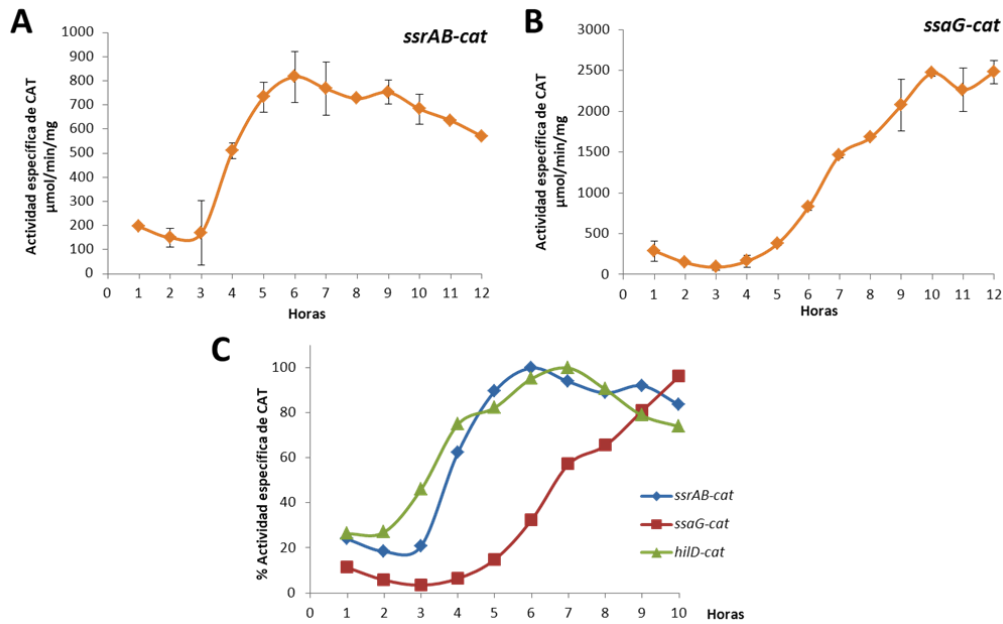
Estos resultados sugieren que la producción de la molécula ppGpp, por las enzimas RelA y SpoT, en respuesta a la escasez de nutrientes, podría estar involucrada en la inducción de la expresión de los genes de SPI-1 específicamente en la fase estacionaria temprana.

## **El desfaseamiento en la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 podría deberse a un mecanismo de regulación postranscripcional sobre el operón *ssrAB***

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se mostró que la expresión de los genes del regulón de SPI-2, *ssaG* y *pipB*, se induce durante la fase tardía de crecimiento estacionario, comprendida entre las horas 5 a 10 en un cultivo de *Salmonella* en el medio LB (Figura 7) (Bustamante *et al.*, 2008, Sezonov *et al.*, 2007). Esto contrasta con la expresión de los genes de SPI-1, los cuales se expresan en la fase estacionaria temprana, comprendida entre las horas 2 a 5 del crecimiento en LB (Figuras 7, 9 y 10 de este trabajo; Bustamante *et al.*, 2008; Sezonov *et al.*, 2007). De manera interesante, en estas condiciones de cultivo, la expresión tanto de los genes de SPI-1 como la de genes de SPI-2, es inducida por el regulador HilD, codificado en SPI-1 (Bustamante *et al.*, 2008). HilD induce directamente la expresión del operón *ssrAB* (Bustamante *et al.*, 2008), localizado en SPI-2 y que codifica para el sistema de dos componentes SsrA/B, el cual regula positivamente a los genes de esta isla (Ochman *et al.*, 1996).

Para determinar si la expresión retrasada de los genes de SPI-2, con respecto a la de los genes de SPI-1, es consecuencia de la regulación del operón *ssrAB*, analizamos las cinéticas de expresión de las fusiones transcripcionales *ssrAB-cat*, *ssaG-cat* e *hilD-cat* en la cepa WT de *S. Typhimurium* crecida en medio LB.



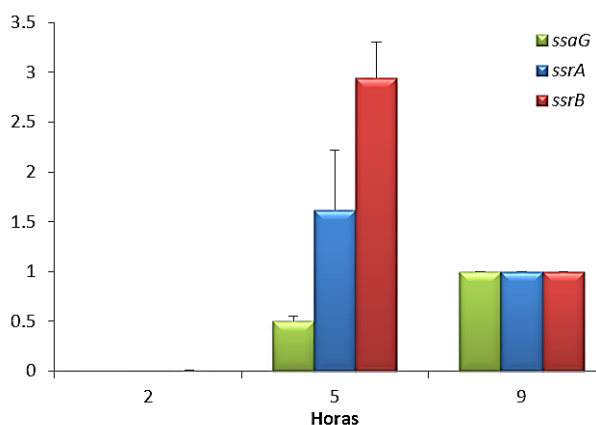


**Figura 14.** La expresión de *ssrAB*, regulador central de SPI-2, comienza a aumentar desde la fase estacionaria temprana, lo que coincide con la regulación por fase de crecimiento de los genes de SPI-1 y contrasta con la de los genes de SPI-2, que comienzan a expresarse hasta la fase estacionaria tardía. Cinéticas de expresión de genes que se encuentran localizados en el locus de SPI-2, *ssrAB* (A) y *ssaG* (B). Las cinéticas se obtuvieron analizando las fusiones transcripcionales de la región reguladora de cada gen al gen reportero *cat* en la cepa silvestre de *Salmonella*. La actividad específica de la enzima CAT se cuantificó a partir de muestras tomadas cada hora de cultivos crecidos en LB durante 10 horas. Los resultados mostrados representan el promedio de al menos dos experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan la desviación estándar. Cinéticas de expresión que muestran el porcentaje de actividad específica de CAT, tomando como 100% el valor más alto obtenido en la cinética de cada gen (C). Los datos empleados para la generación de esta gráfica son los mismos de las gráficas de los paneles A y B y la figura 9.

Sorpresivamente, la expresión de la fusión *ssrAB-cat* aumentó a partir de la hora 3, alcanzando su punto máximo a la hora 6 de crecimiento (Figura 14A). En contraste y como ya se había reportado (Bustamante *et al.*, 2008), la expresión de la fusión *ssaG-cat* se incrementó significativamente a partir de la hora 5, alcanzando su máxima expresión a la hora 10 de crecimiento (Figura 14B). Como el patrón de expresión de la fusión *ssrAB-cat* fue más parecido al patrón de expresión de los genes de SPI-1 que al de los de SPI-2, se hizo una comparación directa de éstos, graficando la actividad de las fusiones como porcentajes de expresión, siendo el 100% su valor máximo de expresión mostrada en las gráficas 14A y 14B. En esta comparación fue evidente que el patrón de transcripción de

*ssrAB* (SPI-2) coincide con el de *hilD* (SPI-1) y no con el de *ssaG* (SPI-2), gen al que regula directamente (Figura 14C).

Para confirmar estos resultados, monitoreamos el nivel de transcripción de los genes *ssrA*, *ssrB* y *ssaG* mediante PCR cuantitativo de tiempo real (qRT-PCR), a las 2, 5 y 9 horas del crecimiento de *S. Typhimurium* en LB, usando pares de oligonucleótidos que amplifican específicamente regiones internas de dichos genes (Tabla 6).



**Figura 15.** La transcripción de *ssrA*, *ssrB* y *ssaG* se detecta desde la hora 5. El RNA total de la cepa silvestre de *Salmonella* fue extraído a las 2, 5 y 9 horas durante el crecimiento de la bacteria en LB. Los niveles de transcrito de *ssrA*, *ssrB* y *ssaG* fueron determinados usando pares de oligonucleótidos específicos para regiones dentro de los genes estructurales, empleándose *gyrA* como control interno para normalizar los resultados. Los datos muestran la expresión relativa de *ssrA*, *ssrB* y *ssaG* con respecto a su expresión a las 9 horas y representan el promedio de tres experimentos realizados por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

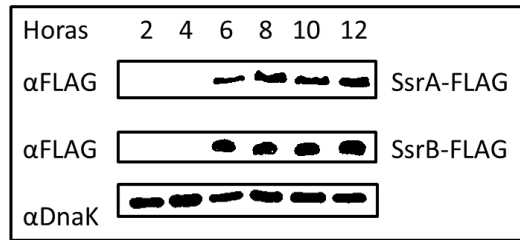
Los ensayos de qRT-PCR mostraron que hay un mayor nivel de los transcritos de *ssrA* y *ssrB* a la hora 5 que a la hora 9. En contraste, el nivel del transcrito de *ssaG* es mayor a la hora 9 que a la hora 5 (Figura 15). Esto concuerda con los datos obtenidos con el análisis de las fusiones transcripcionales, el cual mostró que la fusión *ssrAB-cat* alcanza su nivel máximo alrededor de la hora 5, mientras que la fusión *ssaG-cat* lo hace alrededor de la hora 9 (Figura 14).

En conjunto, estos resultados indican que hay un marcado desfase en el tiempo en que el operón *ssrAB* se transcribe y la transcripción de los genes que dicho sistema de dos componentes regula, como *ssaG*.

En un trabajo previo de nuestro grupo, se había mostrado que la proteína SsrB (codificada en el operón *ssrAB*) presenta un patrón de expresión en LB similar al de los genes de SPI-2, es decir, se expresa en la fase tardía de crecimiento estacionario (Bustamante *et al.*, 2008). Para determinar si la proteína SsrA tiene un patrón similar al de SsrB, como podría esperarse debido a que los genes en los que están codificadas se expresan como operón, analizamos las cinéticas de expresión de las proteínas SsrA y SsrB que llevan el epítipo FLAG fusionado a su extremo carboxilo terminal. Para esto, muestras de cultivos en LB de cepas derivadas de *S. Typhimurium* silvestre (Tabla 4), que expresan SsrA-FLAG y SsrB-FLAG a partir de los genes cromosomales, se tomaron cada dos horas durante un periodo de 12 horas y se analizaron mediante ensayos de Western blot, empleando anticuerpos contra el epítipo FLAG. Como control de carga, la proteína DnaK, que se expresa constitutivamente, fue detectada usando un anticuerpo monoclonal anti-DnaK.

En la figura 16 se observa que ambas proteínas, SsrA y SsrB, se detectan claramente de la hora 6 a la hora 12 del crecimiento. A la hora 4 no hay niveles detectables de estas proteínas (Figura 16), lo cual contrasta con los resultados que muestran que a esta hora ya hay transcripción del operón *ssrAB* (Figura 14). Por otro lado, la presencia a la hora 6 de las proteínas SsrA y SsrB (Figura 16) concuerda con la inducción de la expresión de la fusión *ssaG-cat* en ese punto (Figura 14).

El bajo nivel de síntesis de ambas proteínas durante las primeras horas del crecimiento parece ser uno de los factores limitantes que determinan el punto en el que se expresan los genes de SPI-2. Incluso, estos datos podrían sugerir la existencia de un mecanismo de regulación postranscripcional que provoque el retraso en la traducción de *ssrAB* y por tanto que la expresión de los genes de SPI-2 se desfase con respecto a la expresión de los genes de SPI-1.



**Figura 16.** Las proteínas SsrA y SsrB no se detectan durante la fase exponencial ni la estacionaria temprana del crecimiento de *Salmonella* en LB, pero son evidentes. Las cepas que contienen a los genes *ssrA* y *ssrB* etiquetados la secuencia que codifica para el epítipo FLAG, se cultivaron durante 12 horas en LB. Las muestras fueron tomadas cada dos horas y los lisados totales de células obtenidos de cada muestra se visualizaron en un gel de poliacrilamida al 12%. Las proteínas etiquetadas se detectaron por Western blot usando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Como control de carga, se detectó la proteína DnaK de expresión constitutiva, empleando un anticuerpo monoclonal anti-DnaK.

### **La sobre-expresión de SsrB adelanta la expresión de los genes de SPI-2 a la fase de crecimiento exponencial**

Nuestros resultados sugieren que la expresión de los genes de SPI-2 en la fase tardía de crecimiento estacionario depende de la expresión específica de las proteínas SsrA y SsrB en esta fase. Con el fin de corroborar esto, analizamos si la sobre-expresión constitutiva de las proteínas SsrA y SsrB podría inducir la expresión de la fusión *ssaG-cat* antes de la fase tardía de crecimiento estacionario de *S. Typhimurium* en LB. Para esto, primero determinamos la expresión de SsrB a partir de los plásmidos pT3SsrB y pT3SsrAB, que contienen al gen *ssrB* o al operón *ssrAB* completo, respectivamente, bajo el control del promotor *lac* del vector, el cual es constitutivo en *Salmonella*. Este análisis se hizo en la cepa mutante  $\Delta ssrB$  que contiene los plásmidos pT3SsrB o pT3SsrAB o el vector pMPM-T3, con el fin de que la proteína SsrB detectada proviniera únicamente de los plásmidos. La detección de SsrB se realizó mediante ensayos de Western blot, usando anticuerpos policlonales anti-SsrB, con muestras de cultivos de las cepas tomadas a las horas 2, 5 y 9 de crecimiento. La figura 17A muestra que SsrB se expresó a partir del plásmido pT3SsrB en la horas 2, 5 y 9, en contraste a su expresión a partir del operón *ssrAB* cromosomal etiquetado con el epítipo FLAG, del cual se detecta a la hora 6 pero no a las horas 2 y 4 (Figura 16). La expresión de SsrB a partir del plásmido pT3SsrAB fue menor que la del

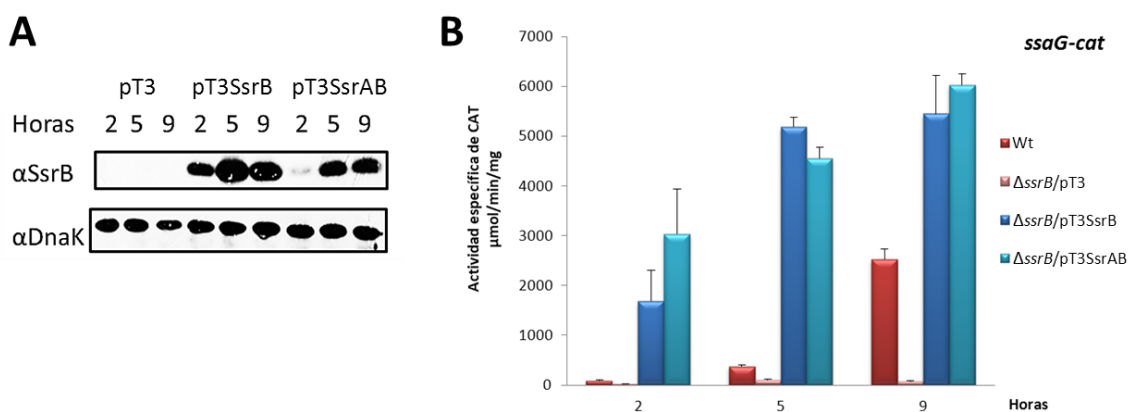
plásmido pT3SsrB, siendo esta diferencia más evidente a la hora 2, punto en el que sólo se detectó una muy débil expresión de SsrB a partir de pT3SsrAB (Figura 17A).

Estos resultados sugieren que *ssrB* se libera de la posible regulación postranscripcional cuando se expresa a partir de un plásmido multicopia, bajo un promotor fuerte y constitutivo.

Sabiendo que SsrB se expresa desde las primeras horas del crecimiento en LB a partir de los plásmidos pT3SsrB y pT3SsrAB, analizamos el efecto de estos plásmidos en la expresión de la fusión *ssaG-cat*, en la mutante  $\Delta ssrB$ , a las horas 2, 5 y 9 de crecimiento.

En la figura 17B se puede observar que la expresión de la fusión *ssaG-cat* se induce en la cepa silvestre a la hora 9 del crecimiento y que ésta no se expresa en la mutante  $\Delta ssrB$  que contiene el vector pMPM-T3. En contraste, en la mutante  $\Delta ssrB$  que contiene los plásmidos pT3SsrB o pT3SsrAB, la fusión *ssaG-cat* se expresó a las horas 2, 5 y 9 del crecimiento.

Estos resultados sugieren que la sobre-expresión constitutiva de SsrB adelanta la expresión de los genes de SPI-2 a la fase de crecimiento exponencial, lo cual sugiere que la concentración de las proteínas SsrA/B es el factor limitante que determina la cinética de expresión que seguirán los genes de SPI-2 durante las diferentes fases de crecimiento.



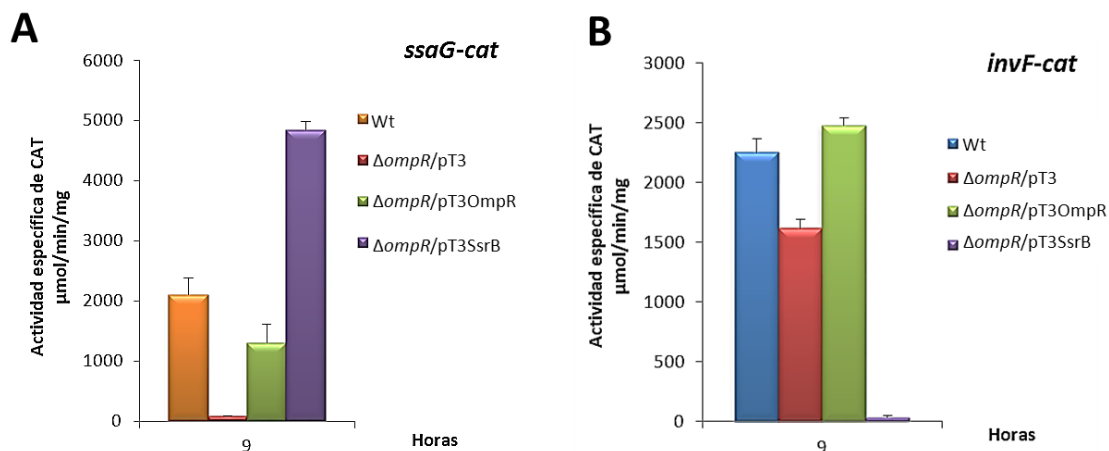
**Figura 17.** La sobre-expresión constitutiva de SsrB adelanta la expresión de *ssaG* a la fase estacionaria temprana. La cepa mutante  $\Delta ssrB$  que contiene tanto a la fusión *ssaG-cat* como a los plásmidos pMPMT3, pT3SsrB o pT3SsrAB, que expresan constitutivamente a SsrB y a SsrA/B, se cultivó durante 9 horas en LB. El nivel de expresión de la proteína SsrB a partir de los plásmidos pT3SsrB y pT3SsrAB se determinó a partir de muestras tomadas a las 2, 5 y 9 horas de crecimiento (A). Los lisados totales de células obtenidos en cada muestra se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12% y las proteínas se detectaron por Western blot usando

el anticuerpo policlonal anti-SsrB. Como control de carga, se detectó la proteína DnaK de expresión constitutiva, empleando un anticuerpo monoclonal anti-DnaK. La expresión de la fusión transcripcional *ssaG-cat*, expresada a partir del plásmido *pssaG-cat*, se analizó en la cepa silvestre y en su derivada mutante  $\Delta$ *ssrB* que contiene o no los plásmidos pT3SsrB y pT3SsrAB, que expresan constitutivamente a SsrB y a SsrA/B, respectivamente (B). La actividad específica de CAT se cuantificó a partir de muestras tomadas a las horas 2, 5 y 9 de crecimiento en LB. Los resultados mostrados representan el promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

### **SsrB reprime la expresión de SPI-1**

Previamente, en nuestro laboratorio se demostró que la expresión de HilA, el regulador positivo central de los genes de SPI-1, disminuye cuando la expresión de SsrB y OmpR, los reguladores positivos de los genes de SPI-2, se incrementa en la fase tardía de crecimiento estacionario (Figura 7) (Bustamante *et al.*, 2008).

Esto podría sugerir que SsrB, OmpR o ambos estuvieran involucrados en la represión de HilA y como consecuencia, del resto de los genes de SPI-1 en la fase tardía de crecimiento estacionario. Para investigar esta posibilidad, analizamos el efecto de la sobreexpresión constitutiva de SsrB y OmpR en la expresión de los genes de SPI-1. Para esto, determinamos la expresión de la fusión transcripcional *invF-cat* en el fondo  $\Delta$ *ompR*, en presencia de los plásmidos pT3SsrB y pT3OmpR. Como control de la expresión de SsrB y OmpR a partir de estos plásmidos, primero monitoreamos la expresión de la fusión *ssaG-cat* en la misma mutante. Ya que OmpR se requiere para la expresión del operón *ssrAB*, esta mutante no expresa ni OmpR ni SsrB. Como se esperaba, la fusión de *ssaG-cat* se expresó en la cepa silvestre a la hora 9 del crecimiento, lo que no sucedió en la mutante  $\Delta$ *ompR* que contiene el vector pMPM-T3 (Figura 18A). La presencia de los plásmidos pT3SsrB o pT3OmpR restauró la expresión de esta fusión en la mutante  $\Delta$ *ompR* (Figura 18A), indicando que SsrB y OmpR se expresan bien a partir de estos plásmidos.



**Figura 18.** La expresión de *invF* se abate al sobre-expresar SsrB pero no se afecta al sobre-expresar OmpR, ambos reguladores de SPI-2. La expresión de las fusiones transcripcionales *ssaG-cat* (A) e *invF-cat* (B), contenidas en los plásmido *pssaG-cat* y *pinvF-cat*, se analizaron en la cepa silvestre y en su derivada mutante  $\Delta ompR$ , que contiene o no, los plásmidos *pT3OmpR* y *pT3SsrB*, que expresan constitutivamente a OmpR y a SsrB, respectivamente (B). La actividad específica de CAT se cuantificó a partir de muestras tomadas a las 9 horas de crecimiento en LB. Los resultados mostrados representan el promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

Por otro lado, la fusión *invF-cat* se expresó en la cepa silvestre a la hora 9 de crecimiento y su expresión no se afectó significativamente en la mutante  $\Delta ompR$  que contiene el vector *pMPM-T3* o el plásmido *pT3OmpR* (Figura 18B). En contraste, la presencia del plásmido *pT3SsrB*, disminuyó drásticamente la expresión de esta fusión en la mutante  $\Delta ompR$  (Figura 18B).

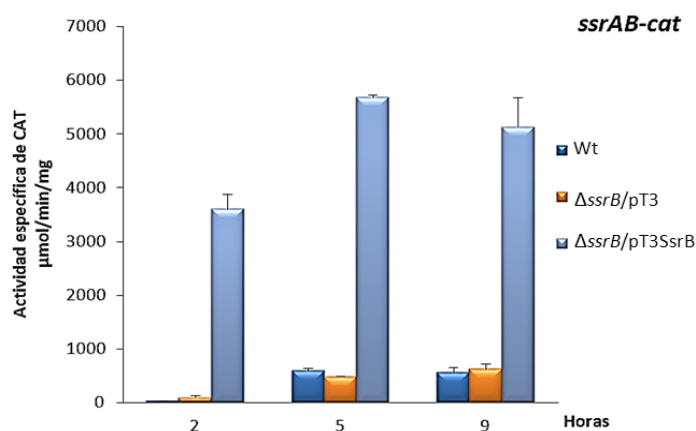
Estos resultados sugieren que la inducción de los genes de SPI-2 en la fase tardía de crecimiento estacionario provoca la disminución en la expresión de los genes de SPI-1, como consecuencia del efecto negativo que tiene el regulador central de SPI-2, SsrB, sobre la expresión de los genes de SPI-1.

### **SsrB se autorregula positivamente en medio mínimo pero el efecto no es claro en LB**

Como algo adicional a nuestro estudio, al analizar la fusión transcripcional *ssrAB-cat* en un fondo mutante  $\Delta ssrB$  en medio LB, observamos que en presencia del plásmido *pT3SsrB*, la expresión de dicha fusión aumenta alrededor de 10 veces, en comparación con

su expresión en la cepa silvestre a las horas 5 y 9 del crecimiento (Figura 19). Inclusive a la hora 2 del crecimiento, donde en la cepa silvestre no se expresa aún la fusión *ssrAB-cat*, su expresión es inducida por la presencia del plásmido pT3SsrB (Figura 19).

Estos resultados indican que SsrB se autorregula positivamente. Sin embargo, la expresión de la fusión *ssrAB-cat* no se afectó en la mutante  $\Delta ssrB$  (Figura 19). Por lo tanto, el efecto de autorregulación positiva de *ssrAB*, cuando *S. Typhimurium* crece en LB, sólo se observa al sobre-expresar SsrB.



**Figura 19.** La sobre-expresión de SsrB provoca un aumento en la expresión de *ssrAB-cat* en LB. La expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat*, expresada a partir del plásmido pssrAB-cat, se analizó en la cepa silvestre y en su derivada mutante  $\Delta ssrB$  que contiene o no, el plásmido pT3SsrB, que expresa constitutivamente a SsrB. La actividad específica de CAT se cuantificó a partir de muestras tomadas a las 2, 5 y 9 horas de crecimiento en LB. Los resultados mostrados representan el promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

En un estudio previo se reportó que *ssrAB* se autorregula positivamente cuando *S. Typhimurium* crece en medio mínimo, considerado un medio de inducción de los genes de SPI-2 (Feng *et al.*, 2003). Por lo tanto, decidimos analizar la autorregulación de *ssrAB* en el medio mínimo N (MM-N), analizando la expresión de la fusión *ssrAB-cat* en la cepa silvestre y su derivada mutante  $\Delta ssrB$  que contiene o no, el vector pMPM-T3 o los plásmidos pT3SsrB o pT3SsrAB, que expresan a SsrB. Las muestras para la cuantificación de la actividad enzimática de CAT se tomaron de cultivos crecidos durante 16 horas.

En la figura 20 se muestra que la expresión de la fusión *ssrAB-cat* disminuye aproximadamente un 50% en la mutante  $\Delta ssrB$  que contiene el vector pMPM-T3, en



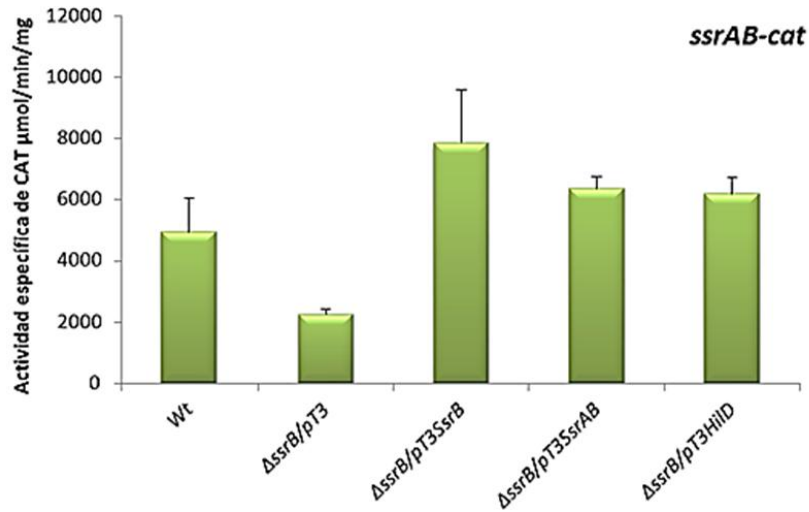
comparación con su expresión en la cepa silvestre. La expresión de esta fusión en la mutante  $\Delta ssrB$  se restaura en presencia de los plásmidos que expresan SsrB (Figura 20). Estos resultados confirman que *ssrAB* se autorregula positivamente cuando *S. Typhimurium* crece en un medio mínimo.

Previamente, nuestro grupo de investigación demostró que existen dos vías para la inducción de los genes de SPI-2. Cuando *Salmonella* crece en el medio LB, el regulador HilD, codificado en SPI-1, junto con OmpR, inducen la expresión del operón *ssrAB* y por lo tanto la expresión de los genes del regulón de SPI-2 (Bustamante *et al.*, 2008). En contraste, cuando *Salmonella* crece en un medio mínimo, la expresión de *ssrAB* se induce de manera independiente de HilD, involucrando a los reguladores EnvZ/OmpR, PhoP/PhoQ, SlyA y el mismo SsrB (Feng *et al.*, 2003, Bijlsma & Groisman, 2005, Deiwick *et al.*, 1999).

El hecho de que la expresión de la fusión *ssrAB-cat* no se afecte en la mutante  $\Delta ssrB$  cuando *S. Typhimurium* crece en LB (Figura 19), pero sí se afecte en esta mutante cuando crece en medio mínimo (Figura 20), junto con nuestros resultados previos que muestran que la expresión de la fusión *ssrAB-cat* se afecta en una mutante  $\Delta hilD$  en LB pero no en medio mínimo (Bustamante *et al.*, 2008), nos hizo pensar que HilD y SsrB podrían tener funciones análogas, pero independientes, en LB y medio mínimo, respectivamente.

Para investigar un poco más sobre esto, analizamos la expresión de la fusión *ssrAB-cat* en la mutante  $\Delta ssrB$  crecida en el MM-N, en presencia del plásmido pT3HilD, que expresa constitutivamente a HilD. Interesantemente, la expresión de HilD a partir de este plásmido incrementó el nivel de expresión de la fusión *ssrAB-cat*, a un nivel similar al que lo hicieron los plásmidos que expresan a SsrB (Figura 20).

Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que HilD y SsrB tienen funciones análogas, al inducir la expresión del operón *ssrAB* y por lo tanto la expresión de los genes de SPI-2, cuando *S. Typhimurium* crece en LB y medio mínimo, respectivamente.



**Figura 20.** SsrB e HilD sobre-expresados son capaces de restaurar la expresión de la fusión *ssrAB-cat* en una mutante  $\Delta\text{ssrB}$  crecida en medio mínimo N (MM-N). La expresión de la fusión transcripcional *ssrAB-cat* se analizó en la cepa silvestre y en su derivada mutante  $\Delta\text{ssrB}$  que contiene los plásmidos pT3SsrB, pT3SsrAB y pT3HilD. La actividad específica de la enzima CAT se cuantificó a partir de muestras tomadas a las 16 horas de crecimiento en cultivos crecidos en MM-N. Los resultados muestran valores obtenidos de dos ensayos independientes de ensayos realizados por duplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

## VII. Discusión y conclusiones

Un mecanismo común de evolución bacteriano es la adquisición de material genético mediante transferencia horizontal (Ochman *et al.*, 2000). Sin embargo, para que genes adquiridos beneficien a la bacteria deben expresarse en el tiempo y lugar en el que sean necesarios. Los reguladores que se requieren para controlar la expresión de dichos genes pueden estar contenidos dentro del material genético adquirido; sin embargo, usualmente los genes recién adquiridos también son acoplados a redes reguladoras ancestrales de la bacteria receptora (Dorman, 2009). Por lo tanto, muchos reguladores ancestrales se encargan principalmente de regular genes que fueron adquiridos horizontalmente (Pérez & Groisman, 2009).

Los genes de virulencia son uno de los casos más claros que evidencian la importancia de la integración reguladora del material genético adquirido por transferencia horizontal, ya que una gran cantidad de patógenos acopla la regulación de la expresión de genes de virulencia a redes reguladoras preexistentes en su genoma (Dalebroux *et al.*, 2010).

En el caso de *Salmonella*, SPI-1 y SPI-2 son las islas de patogenicidad más estudiadas y cuya función se conoce mejor (Hansen-Wester & Hensel, 2001). La adquisición de estas islas en diferentes eventos de transferencia horizontal, le confirió a *Salmonella* la capacidad de infectar y colonizar exitosamente a sus hospedadores. Por lo que el adecuado control de la expresión de estos genes fue crucial para su mantenimiento y aprovechamiento. Para esto, las islas están sujetas a estrictos mecanismos de regulación que involucran reguladores que son parte de ellas, pero también reguladores cuyos genes ya estaban presentes en el genoma de la bacteria antes de que adquiriera dichas islas. Estos reguladores fueron reclutados para ser parte del mecanismo de regulación que aseguró la adecuada expresión, en tiempo y espacio, de los factores de virulencia, codificados en los genes de las islas, durante la patogénesis de la bacteria y evitar así que la expresión no controlada de los genes que contienen le provoque gastos excesivos de energía a la bacteria o efectos que afecten su viabilidad.

En nuestro grupo de investigación hemos demostrado la existencia de una cascada reguladora que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 cuando se crece a

*Salmonella* en el medio de cultivo LB. La cascada inicia con el sistema de dos componentes BarA/SirA codificado fuera de las SPIs. SirA induce la expresión de los RNAs no traducidos CsrB y CsrC, los que se unen a la proteína CsrA, secuestrándola (Romeo, 1998, Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008, Babitzke & Romeo, 2007), con lo que contrarrestan el control postranscripcional negativo que ejerce CsrA sobre el RNA mensajero de HilD, regulador codificado dentro de SPI-1 (Martínez *et al.*, sometido). A su vez, HilD es controlado por un mecanismo de autorregulación positiva (Ellermeier *et al.*, 2005; Olekhnovich and Kadner, 2002), por mecanismos que actúan a nivel postranscripcional y que son mediados por HilE (Baxter *et al.*, 2003) y la proteasa Lon (Boddicker & Jones, 2004, Takaya *et al.*, 2005).

El regulador HilD establece una comunicación transcripcional entre los genes de SPI-1 y SPI-2 cuando, en diferentes fases de la curva de crecimiento, induce la expresión de HilA y del sistema SsrA/B, los reguladores centrales positivos de SPI-1 y SPI-2, respectivamente. HilD, al unirse directamente a las regiones reguladoras de éstos, contrarresta el efecto negativo que H-NS, un represor global, ejerce sobre estos genes (Bustamante *et al.*, 2008a, Schechter & Lee, 2001, Schechter *et al.*, 1999). Una vez que HilA y SsrA/B se expresan, inducen la expresión del resto de los genes de SPI-1 y SPI-2, respectivamente (Fass & Groisman, 2009, Altier, 2005, Jones, 2005, Ellermeier & Slauch, 2007).

En un estudio previo realizado en nuestro grupo de investigación, se analizó la cinética de expresión de algunos genes pertenecientes a los regulones de SPI-1 y SPI-2 durante el crecimiento en LB, medio que ha sido empleado para estudiar la expresión de los genes de SPI-1, por lo que se cree que simula las condiciones encontradas por la bacteria en el intestino (Bustamante *et al.*, 2008). En este estudio encontramos que los genes de SPI-1 y SPI-2 se expresan diferencialmente de manera dependiente de la fase de crecimiento, ya que mientras que los genes de SPI-1 se expresan durante la fase estacionaria temprana, los genes de SPI-2 lo hacen durante la fase estacionaria tardía (Figura 7), a pesar de que su expresión en este medio depende del regulador HilD, codificado en SPI-1 (Bustamante *et al.*, 2008). Asimismo, en este estudio se encontró que la expresión de los genes de SPI-1 se reprime al alcanzar la fase estacionaria tardía, misma en la que se induce la expresión del regulón SPI-2.

En el presente trabajo se buscó determinar cuáles son los elementos que están involucrados en la regulación dependiente de fase de crecimiento de los genes de SPI-1 y SPI-2. Específicamente, quisimos averiguar qué es lo que determina que los genes de SPI-1 se induzcan durante la fase estacionaria temprana, investigar qué es lo que provoca que estos genes disminuyan su expresión al llegar a la fase estacionaria tardía y determinar las causas por las que los genes de SPI-2 inducen su expresión hasta la fase estacionaria tardía.

Dado que en la cinética que habíamos reportado previamente sólo habíamos analizado tres genes de los pertenecientes al regulón de SPI-1 (*hilA*, *invF* y *sopB*) (Bustamante *et al.*, 2008), comenzamos por determinar, mediante fusiones transcripcionales, si el resto de los genes que conforman la cascada reguladora que controla los genes de SPI-1 presentaba un patrón de expresión parecido entre sí, dependiente de la fase de crecimiento.

Al analizar la cinética de expresión durante el crecimiento en LB, observamos que todos los genes que conforman la cascada reguladora, *barA*, *sirA*, *csrB*, *csrC*, *hilD*, *hilA* e *invF*, mostraron un patrón similar de inducción durante la fase estacionaria temprana (Figuras 9 y 10). Al analizar con detalle su expresión durante las primeras horas de crecimiento, incluso pudimos observar la inducción secuencial de *sirA*, *csrB*, *hilD* e *hilA*, lo cual concuerda con el papel que tiene cada uno de ellos dentro de la cascada de regulación que controla a SPI-1 (Figura 10C) (Martínez *et al.*, sometido).

Como el patrón de expresión de todos estos genes fue similar, la regulación dependiente de fase de crecimiento de los genes que se encuentran al final de la cascada podría ser un reflejo de la regulación de los genes que se encuentran al inicio de ésta. SirA es el regulador que se encuentra al inicio de esta cascada, así que analizamos si la presencia de SirA en fases más tempranas, podría adelantar la expresión del resto de los genes. Para determinar esto, evaluamos si la presencia de un plásmido que expresa constitutivamente a SirA podría adelantar la expresión de *invF* y *csrB*. Sin embargo, aunque la expresión constitutiva de SirA restauró los niveles de ambas fusiones en una mutante  $\Delta sirA$ , el patrón de expresión dependiente de fase de crecimiento no cambió, es decir, la expresión de ambos genes se observó hasta la fase estacionaria temprana (Figura 11). Esto sugiere que la regulación por fase de crecimiento ocurre no depende de su regulación en cascada de SPI-1, sino que hay elementos adicionales de regulación involucrados.

Sin embargo, habría que descartar la posibilidad de que SirA, a pesar de que estuviera presente desde la fase de crecimiento exponencial, no se activara sino hasta que se presente la condición ambiental requerida para esto, en la fase estacionaria temprana. SirA forma parte de un sistema de dos componentes junto con BarA, donde BarA es la cinasa detectora de señales ambientales y que en respuesta a éstas, se autofosforila para después activar a SirA fosforilándola (Altier *et al.*, 2000). Así, aún cuando SirA estuviera presente durante la fase exponencial, no habría manera de que ésta pudiera ser fosforilada, puesto que la expresión de BarA se induce hasta la fase estacionaria temprana (Figura 9).

Se ha reportado que SirA puede ser fosforilada en presencia de acetato incluso en una mutante  $\Delta barA$ , debido a que el acetato puede ser transformado a acetil fosfato y éste puede fosforilar directamente a SirA (Lawhon *et al.*, 2002, González Chávez *et al.*, 2010). Por lo tanto, una posible manera de activar a SirA desde la fase de crecimiento exponencial sería adicionando acetato al medio, lo que provocaría que BarA, al detectar la señal, fosforile a SirA, aumentando la afinidad de éste por sus promotores blanco. De esta manera se podría evaluar el efecto de SirA, activado desde la fase exponencial, sobre la expresión de los genes de la cascada de regulación de SPI-1.

Adicionalmente, como otra manera de averiguar si el patrón de expresión de los genes de SPI-1 es debido a su regulación en cascada, se podría evaluar el efecto de la sobre-expresión de otros reguladores de la cascada que no dependan de alguna señal para ser activos, como podría ser el caso de CsrB.

BarA/SirA induce la expresión de CsrB y CsrC, los cuales inducen la expresión de HilD, que a su vez induce la expresión de *hilA* al contrarrestar la represión de H-NS (Olekhovich & Kadner, 2007, Schechter & Lee, 2001). Por lo tanto, en ausencia de H-NS, la cascada reguladora que va de BarA/SirA a HilD ya no se requeriría para la expresión de *hilA*. En este estudio encontramos que la expresión de *hilA* no se induce sino hasta la fase temprana de crecimiento estacionario aún en ausencia de H-NS (Figura 12). Esto indica que los reguladores Bar/SirA, CsrB, CsrC e HilD se requieren para inducir la expresión de *hilA*, pero no están involucrados en su regulación por fase de crecimiento. Esto explicaría en parte por qué la expresión constitutiva de SirA no modificó el patrón de expresión de *invF*.

Interesantemente, la cinética de expresión de *hilE* y *csrA* mostró el mismo patrón que *hilD*, al que regulan negativamente. Al ser HilD el regulador central que media la

comunicación transcripcional entre SPI-1 y SPI-2, induciendo la expresión de los genes de ambas islas, su expresión y actividad deben estar finamente controladas. Hile y CsrA regulan negativamente a HilD a nivel postranscripcional. El hecho de que la expresión de *csrA* e *hile* se induzca de manera similar a la de *hilD* y a la del resto de los genes del regulón SPI-1 (Figura 9), sugiere que el efecto negativo de CsrA e Hile permite mantener la concentración adecuada de HilD, que favorezca la expresión de los genes de SPI-1, más que evitar que estos genes se expresen.

El patrón de expresión por fase de crecimiento del regulón SPI-1 podría también estar condicionado por la acción de algún regulador negativo que evita la inducción de estos genes durante la fase de crecimiento exponencial, o por algún regulador positivo, adicional a los que conforman la cascada reguladora, que induce su expresión hasta la fase estacionaria temprana. Nuestros resultados indican que la ausencia de Hile, H-NS y Lon, reportados como reguladores negativos de la expresión de SPI-1 (Baxter *et al.*, 2003, Boddicker & Jones, 2004, Olekhovich & Kadner, 2007), así como la ausencia de RpoS, el factor sigma involucrado en la expresión de genes en fase estacionaria (Dong & Schellhorn, 2010), no modifica la regulación por fase de crecimiento de *hilA* (Figura 12 y 13A). Sin embargo, en ausencia de RelA y SpoT no hubo expresión de *hilA* e *hilD* (Figura 13), lo cual indica que la respuesta a la escasez de nutrientes mediada por la molécula ppGpp podría ser un factor importante para la inducción de estos genes en la fase estacionaria temprana. En un estudio previo se había reportado que la molécula ppGpp es importante para la expresión de *hilA* (Song *et al.*, 2004). Dado que nosotros observamos el mismo efecto también para *hilD* (Figura 13), esto indica que el efecto de ppGpp sobre la expresión de *hilA*, podría deberse al efecto que esta molécula tiene sobre la expresión de *hilD*. Sin embargo, esta molécula no está involucrada en la expresión de todos los genes que conforman la cascada de regulación de SPI-1, ya que en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio se mostró que la expresión de *sirA* no se afecta en la doble mutante  $\Delta relA \Delta spoT$  (Bustamante *et al.*, 2008).

La molécula ppGpp es sintetizada por las enzimas RelA y SpoT a partir de GDP o GTP principalmente en respuesta a la falta de aminoácidos, aunque también puede ser sintetizada por falta de fosfato, hierro y carbono, así como por perturbaciones en el metabolismo de ácidos grasos (Dalebroux *et al.*, 2010). Las enzimas que controlan la

síntesis y degradación de ppGpp pueden ser reguladas transcripcional y postranscripcionalmente cuando los patógenos se encuentran bajo condiciones de estrés durante la infección, como alta osmolaridad, pH extremo o sustancias químicas dañinas. ppGpp puede mediar sus efectos fisiológicos a través de un control transcripcional directo o indirecto (Dalebroux *et al.*, 2010). Los promotores que son activados por ppGpp, generalmente tienen un contenido bajo de G+C en una región dentro del promotor entre los nucleótidos -10 y +1 (conocida como la región discriminadora) (Haugen *et al.*, 2008), lo que coincide con el bajo contenido de G+C de las islas de patogenicidad en *Salmonella*. Es posible que la inducción de SPI-1 mediada por ppGpp se presente cuando la bacteria se enfrenta a condiciones adversas, como lo que ocurre durante la fase de crecimiento estacionaria en LB, cuando comienzan a escasear los nutrientes (Baev *et al.*, 2006). Además, se ha observado que una mutante en *relA* y *spoT* está atenuada en virulencia en un modelo murino de infección sistémica y no es capaz de invadir células epiteliales, lo que confirma el papel de ppGpp en la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 *in vivo* (Pizarro-Cerda & Tedin, 2004).

A pesar de que la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 se induce por HilD, codificado en SPI-1, la expresión de éstos ocurre en distintas fases del crecimiento en LB, en la fase estacionaria temprana y estacionaria tardía, respectivamente (Figura 7). HilD regula la expresión de los genes de SPI-2 al inducir directamente la expresión del operón *ssrAB*, localizado en SPI-2, que codifica para el sistema de dos componentes SsrA/B, regulador positivo central de esta isla (Deiwick *et al.*, 1999, Bustamante *et al.*, 2008). De manera interesante, el patrón de transcripción de *ssrAB* fue similar al patrón de *hilD* y de los demás genes del regulón SPI-1, es decir, este operón se transcribe principalmente durante la fase estacionaria temprana (Figura 14A), a diferencia de *ssaG*, gen de SPI-2, que se transcribe durante la fase estacionaria tardía (Figura 14B). Estos resultados indican que hay un desfase entre la transcripción de *ssrAB* y la de *ssaG*, gen regulado por SsrA/B (Feng *et al.*, 2003, Walthers *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de que el transcrito de *ssrAB* se produce desde la fase estacionaria temprana, las proteínas SsrA y SsrB se detectaron hasta la fase estacionaria tardía (Figura 16), coincidiendo con la fase de inducción del gen *ssaG* (Figura 14B). La diferencia entre la transcripción de *ssrAB* y la



detección de las proteínas SsrA y SsrB, es evidente a la hora 4 del crecimiento en LB, donde *ssrAB* se transcribe (Figura 14A) pero las proteínas no fueron detectadas (Figura 16).

Previamente se había especulado que el desfase en la expresión de los genes de SPI-2 con respecto a los de SPI-1 podría deberse a que HilD tuviera una mayor afinidad por la región reguladora de *hilA* que por la de *ssrAB* (Bustamante *et al.*, 2008). Sin embargo, esto no parecería ser así, pues nuestros resultados indican que HilD induce la transcripción de *hilA* y *ssrAB* de manera simultánea.

Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo de regulación postranscripcional sobre *ssrAB*, que retardaría su traducción hasta la fase estacionaria tardía y por lo tanto retrasaría también la expresión de los genes de SPI-2.

Un ejemplo claro de regulación postranscripcional es el mediado por el sistema Csr. CsrA es una proteína de unión a RNA que evita la traducción de los transcritos que regula al unirse a las regiones líderes que contienen los sitios de unión al ribosoma (RBS), lo cual favorece que dichos transcritos sean degradados (Romeo, 1998). El efecto negativo de CsrA es contrarrestado por la acción de dos RNAs no traducidos, CsrB y CsrC, los cuales contienen múltiples sitios de unión a CsrA y por lo tanto la secuestran, permitiendo así que los transcritos regulados por CsrA, puedan ser traducidos (Babitzke & Romeo, 2007). CsrA regula negativamente a nivel postranscripcional la expresión de *hilD* y por lo tanto la de los genes de SPI-1 y SPI-2. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que pudiera estar involucrada directamente en la regulación postranscripcional de *ssrAB*. Una aproximación para determinar si el sistema Csr está involucrado sería haciendo ensayos de retardamiento en gel (EMSA, por sus siglas en inglés Electrophoretic Mobility Shift Assay) en el que se evaluaría la afinidad de la proteína CsrA por el mensajero de *ssrAB* obtenido mediante transcripción *in vitro*.

Otro ejemplo de regulación postranscripcional es el que involucra a RNAs pequeños (sRNA), cuya transcripción muchas veces depende de la fase de crecimiento. A la fecha hay múltiples reportes de sRNAs que regulan la traducción y/o estabilidad de mRNA de genes de virulencia o genes que participan en la respuesta a estrés (Romby *et al.*, 2006). En la mayoría de los casos actúan directamente en el mRNA blanco, pero como en el caso de CsrB y CsrC, también pueden actuar al secuestrar a proteínas reguladoras (Babitzke & Romeo, 2007). Se han descrito mecanismos de regulación de este tipo, que controlan la

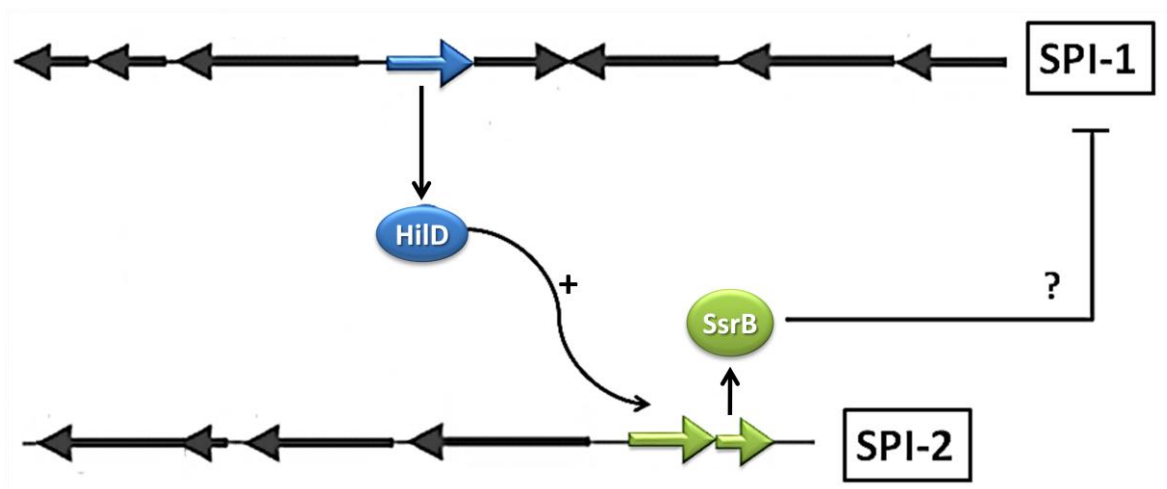
expresión de genes de virulencia en *Vibrio cholerae* (Lenz *et al.*, 2004) y *Streptococcus aureus* (Novick, 2003). Un estudio reciente demostró la existencia de sRNAs dentro de islas genéticas de *S. Typhimurium*, incluso encontrando que muchos de los genes de sRNA codificados en islas (*isr*) estaban asociados a condiciones ambientales de estrés y a la fase estacionaria (Padalon-Brauch *et al.*, 2008). También se han encontrado RNAs pequeños codificados dentro de SPI-1, que regulan genes localizados fuera de las SPIs (Vogel, 2009). Incluso la expresión de algunos de estos sRNAs se induce cuando *Salmonella* se encuentra dentro de macrófagos o durante el crecimiento en medio mínimo, lo que sugiere que podrían participar en el proceso de infección (Padalon-Brauch *et al.*, 2008).

Otros elementos involucrados en mecanismos de regulación postranscripcional que responden a cambios ambientales específicos son los riboswitches (Geissmann *et al.*, 2009). Los riboswitches son estructuras que se forman en las regiones 5' de los RNAs y están compuestos por un dominio de aptámero, al que se une un metabolito y una plataforma de expresión, que “interpreta” los cambios estructurales inducidos por la unión del ligando para regular la expresión genética (Roth & Breaker, 2009). Se ha visto que muchos riboswitches están involucrados en las respuestas a cambios fisiológicos, estrés y virulencia (Geissmann *et al.*, 2009). En *Salmonella* la expresión del transportador de magnesio, MgtA, está controlada por este tipo de sistema (Cromie & Groisman, 2010).

La proteína SsrB pudo ser detectada en la fase de crecimiento exponencial cuando se expresó a partir de plásmidos multicopia bajo el control de un promotor constitutivo fuerte (Figura 17). Además, la expresión temprana de SsrB a partir de estos plásmidos adelantó la expresión de *ssaG* a la fase de crecimiento exponencial (Figura 17). De haber un mecanismo de regulación postranscripcional es evidente que éste no estaría actuando cuando SsrB se expresa a partir de dichos plásmidos. Es posible que el exceso de transcrito de *ssrAB* producido no alcance a ser controlado por la posible regulación postranscripcional.

Por otro lado, estos resultados demuestran que el factor limitante para que los genes de SPI-2 se expresen hasta la fase tardía de crecimiento estacionario es la presencia de SsrB. Esto apoya a nuestros resultados que indican que el desfase entre la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 podría estar determinado por el retraso que hay entre la transcripción del operón *ssrAB* y la aparición de las proteínas SsrA y SsrB.

En un estudio previo habíamos encontrado que la expresión de HilA, el regulador central de los genes de SPI-1 disminuía cuando la expresión de OmpR y SsrB, reguladores de SPI-2, se induce, durante la fase tardía de crecimiento estacionario. Nuestros resultados muestran que la expresión de *invF*, un gen de SPI-1, disminuye drásticamente al sobre-expresar a SsrB, pero no a OmpR (Figura 18), lo que indica que SsrB está involucrado en la represión de los genes de SPI-1 en esta fase de crecimiento. Consistentemente con estos resultados, la secreción de proteínas dependiente de SPI-1 también se reprime al sobre-expresar a SsrB, pero no a OmpR (Bustamante, no reportado). Estos resultados indican que la comunicación transcripcional entre SPI-1 y SPI-2 es recíproca (Figura 21). Previamente habíamos reportado que HilD, codificado en SPI-1, induce la expresión de SPI-2 al promover la expresión de *ssrAB*, el regulador central de SPI-2 (Bustamante *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en este estudio indican que la sobre-expresión de SsrB reprime la expresión de los genes de SPI-1, revelando una comunicación adicional inversa entre SPI-2 y SPI-1. Queda por investigarse a qué nivel de la cascada que controla el regulón SPI-1 se da la represión mediada por SsrB y el mecanismo involucrado.



**Figura 21.** SsrB e HilD participan en una comunicación transcripcional recíproca entre SPI-1 y SPI-2, durante el crecimiento de *Salmonella* en LB. HilD, codificado dentro de SPI-1, regula positivamente al operón *ssrAB*, que codifica el sistema SsrA/B, localizado en SPI-2. SsrB, a su vez, tiene un efecto negativo sobre la expresión de los genes de SPI-1. El nivel de la cascada de activación de SPI-1 en el que SsrB ejerce su efecto represor se desconoce.

Adicionalmente, un resultado interesante que obtuvimos en este estudio fue que la sobre-expresión de SsrB incrementa notablemente la expresión del operón *ssrAB* cuando se

crece a *Salmonella* en el medio LB, indicando que SsrB se autorregula positivamente (Figura 19). Sin embargo, esto no fue evidente al analizar la expresión de *ssrAB* en una mutante  $\Delta$ *ssrB*, en la que la expresión fue similar a la mostrada en la cepa silvestre (Figura 19). En contraste, la expresión de *ssrAB* en esta mutante disminuyó cuando se analizó la expresión en el medio de cultivo mínimo (Figura 20), hecho que concuerda con los resultados obtenidos en un estudio reportado previamente (Feng *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que la autorregulación positiva de SsrB podría ser más importante en el medio mínimo que en el medio LB, ya que en éste último sólo es evidente al sobre-expresar a SsrB (Figura 19).

La expresión del operón *ssrAB* puede ser inducida por dos diferentes vías, dependiendo del medio de cultivo en el que se crece a *Salmonella*. En el medio LB, su expresión depende tanto de HilD, codificado en SPI-1, como de OmpR (Bustamante *et al.*, 2008), mientras que en el medio mínimo su expresión depende de los reguladores OmpR, PhoP, SlyA (Fass & Groisman, 2009) y como muestran los resultados de este estudio, de la autorregulación del propio SsrB.

Algo interesante, es que HilD se requiere para la expresión de *ssrAB* en el medio LB, pero no en el medio mínimo (Bustamante *et al.*, 2008), mientras que SsrB se requiere para su propia expresión en medio mínimo, pero no en el medio LB (Figura 19). Por otro lado, HilD induce la expresión de *ssrAB* en LB al contrarrestar la represión que H-NS ejerce sobre el promotor de este operón (Bustamante *et al.*, 2008). Se ha reportado que SsrB también actúa como desrepresor de H-NS para inducir la expresión del regulón SPI-2 (Walthers *et al.*, 2007), lo cual sugiere que también podría contrarrestar la represión de H-NS sobre su propio promotor, como lo hace HilD para inducir la expresión de *ssrAB* en LB.

Nuestros resultados muestran que la sobre-expresión de HilD puede suplir la ausencia de SsrB para inducir la expresión del operón *ssrAB* en medio mínimo. En conjunto, estos resultados sugieren que HilD y SsrB podrían tener una función análoga en la inducción del operón *ssrAB* cuando *Salmonella* crece en medio LB y medio mínimo, respectivamente. Esto explicaría por qué la autorregulación positiva de SsrB no es importante en LB, donde HilD estaría contrarrestando la represión de *ssrAB* mediada por H-NS y por qué HilD no se requiere para la expresión de *ssrAB* en medio mínimo, donde SsrB estaría autorregulándose positivamente, probablemente también al contrarrestar la

represión mediada por H-NS. De ser así, esto ilustraría un interesante mecanismo de regulación que *Salmonella* adaptó evolutivamente para contrarrestar la represión de *ssrAB* mediada por H-NS y, de esta manera, inducir los genes de SPI-2 en dos diferentes condiciones de crecimiento, en LB simulando las condiciones encontradas por la bacteria en el intestino y en MM-N las encontradas en la fase intracelular de la infección.

## VIII. Perspectivas

- Determinar si la expresión de los RNAs no codificantes CsrB y CsrC está regulada también por RelA y SpoT, para así determinar en qué punto de la cascada que controla el regulón SPI-1, actúa la molécula ppGpp.
- Realizar cinéticas de expresión para comparar el nivel de transcripción de *ssrAB* y la presencia de las proteínas SsrA y SsrB mediante Western blot, RT-PCR y fusiones traduccionales, con el fin de analizar el posible mecanismo de regulación postranscripcional sobre *ssrAB*.
- Analizar la expresión de fusiones transcripcionales de los genes que conforman la cascada de regulación de SPI-1, en presencia del plásmido que sobre-expresa a SsrB, así como en una mutante  $\Delta$ *ssrB*. Esto para determinar a qué nivel de la cascada se da la represión de SsrB sobre los genes de SPI-1.
- Evaluar si la presencia del plásmido que sobre-expresa a SsrB es capaz de restaurar la expresión de una fusión transcripcional *ssrAB-cat* en una mutante  $\Delta$ *hilD* crecida en el medio de cultivo LB. Lo anterior con el fin de comprobar que HilD y SsrB tienen papeles análogos para inducir la expresión de *ssrAB* y los genes de SPI-2, en LB y MM-N, respectivamente.

## IX. Apéndice

### Medios de cultivo empleados

#### Luria-Bertani (LB)

Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	10 g

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

#### Medio mínimo N (MM-N)

KCl	5 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.5 mM
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM
Tris HCl pH7.5	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 µM
Glicerol	0.5% v/v
Casaminoácidos	0.1%

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

#### SOC

Bacto-triptona	2 g
Extracto de levadura	0.5 g
KCl 1M	200 µl
MgSO <sub>4</sub> 1M	1 ml
Glucosa	0.36 g

Se afora a 200 ml con agua desionizada y es esterilizado 20 min a 121°C a 15 libras de presión.

## Reactivos utilizados para Western blot

- Buffer de transferencia

Tris	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0.375% v/v
Metanol	20% v/v

- PBS 10X

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

Se afora a 1 litro con agua MQ, se ajusta el pH a 7.4 y es esterilizado 20 min a 121°C a 15 libras de presión.

- PBS-T

PBS 10X	100 ml
Tween-20	3 ml

Aforado a 1 litro con agua MQ.

- Solución bloqueadora

Leche en polvo sin grasa	1.5 g
PBS-T	30 ml



## X. Referencias

- Akbar, S. L. M. Schechter, C. P. Lostroh & C. A. Lee, (2003) AraC/XylS family members, HilD and HilC, directly activate virulence gene expression independently of HilA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **47**: 715-28.
- Altier, C., (2005) Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* **43 Spec No**: 85-92.
- Altier, C., M. Suyemoto, A. I. Ruiz, K. D. Burnham & R. Maurer, (2000) Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Mol Microbiol* **35**: 635-646.
- Babitzke, P. & T. Romeo, (2007) CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol* **10**: 156-163.
- Baev, M. V., D. Baev, A. J. Radek & J. W. Campbell, (2006) Growth of *Escherichia coli* MG1655 on LB medium: monitoring utilization of amino acids, peptides, and nucleotides with transcriptional microarrays. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**: 317-322.
- Bajaj, V., R. L. Lucas, C. Hwang & C. A. Lee, (1996) Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol* **22**: 703-714.
- Bakowski, M. A., V. Braun & J. H. Brumell, (2008) *Salmonella*-containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic* **9**: 2022-2031.
- Baños, R. C., A. Vivero, S. Aznar, J. García, M. Pons, C. Madrid & A. Juárez, (2009) Differential regulation of horizontally acquired and core genome genes by the bacterial modulator H-NS. *PLoS Genet* **5**: e1000513.
- Barthel, M., S. Hapfelmeier, L. Quintanilla-Martínez, M. Kremer, M. Rohde, M. Hogardt, K. Pfeffer, H. Russmann & W. D. Hardt, (2003) Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun* **71**: 2839-2858.
- Bäumler, A. J., R. M. Tsolis & F. Heffron, (1996) Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **64**: 1862-1865.
- Baxter, M. A., T. F. Fahlen, R. L. Wilson & B. D. Jones, (2003) HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infection and immunity* **71**: 1295-1305.
- Bijlsma, J. J. & E. A. Groisman, (2005) The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **57**: 85-96.
- Boddicker, J. D. & B. D. Jones, (2004) Lon protease activity causes down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells. *Infection and immunity* **72**: 2002-2013.
- Brosius, J., (1984) Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene* **27**: 151-160.
- Brown, N. F., B. A. Vallance, B. K. Coombes, Y. Valdez, B. A. Coburn & B. B. Finlay, (2005) *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS Pathog* **1**: e32.

- Bustamante, V. H., L. C. Martínez, F. J. Santana, L. A. Knodler, O. Steele-Mortimer & J. L. Puente, (2008) HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 14591-14596.
- Coburn, B., G. A. Grassl & B. B. Finlay, (2007) *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol* **85**: 112-118.
- Coombes, B. K., B. A. Coburn, A. A. Potter, S. Gomis, K. Mirakhor, Y. Li & B. B. Finlay, (2005) Analysis of the contribution of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine ileal loop model and a murine model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* **73**: 7161-7169.
- Criss, A. K. & J. E. Casanova, (2003) Coordinate regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion of epithelial cells by the Arp2/3 complex and Rho GTPases. *Infect Immun* **71**: 2885-2891.
- Cromie, M. J. & E. A. Groisman, (2010) Promoter and riboswitch control of the Mg<sup>2+</sup> transporter MgtA from *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **192**: 604-607.
- Chan, K., S. Baker, C. C. Kim, C. S. Detweiler, G. Dougan & S. Falkow, (2003) Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar Typhimurium DNA microarray. *J Bacteriol* **185**: 553-563.
- Dalebroux, Z. D., S. L. Svensson, E. C. Gaynor & M. S. Swanson, (2010) ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 171-199.
- Darwin, K. H. & V. L. Miller, (1999) Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* **12**: 405-428.
- Darwin, K. H. & V. L. Miller, (2000) The putative invasion protein chaperone SicA acts together with InvF to activate the expression of *Salmonella typhimurium* virulence genes. *Mol Microbiol* **35**: 949-960.
- De Keersmaecker, S. C., K. Marchal, T. L. Verhoeven, K. Engelen, J. Vanderleyden & C. S. Detweiler, (2005) Microarray analysis and motif detection reveal new targets of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulatory protein, including *hilA* itself. *J Bacteriol* **187**: 4381-4391.
- Deiwick, J., T. Nikolaus, S. Erdogan & M. Hensel, (1999) Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol* **31**: 1759-1773.
- Dong, T. & H. E. Schellhorn, (2010) Role of RpoS in virulence of pathogens. *Infect Immun* **78**: 887-897.
- Dorman, C. J., (2007) H-NS, the genome sentinel. *Nat Rev Microbiol* **5**: 157-161.
- Dorman, C. J., (2009) Global regulators and environmental adaptation in Gram-negative pathogens. *Clin Microbiol Infect* **15 Suppl 1**: 47-50.
- Ellermeier, C. D., J. R. Ellermeier & J. M. Slauch, (2005) HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPII type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **57**: 691-705.
- Ellermeier, J. R. & J. M. Slauch, (2007) Adaptation to the host environment: regulation of the SPII type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol* **10**: 24-29.
- Fahlen, T. F., R. L. Wilson, J. D. Boddicker & B. D. Jones, (2001) Hha is a negative modulator of transcription of *hilA*, the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion gene transcriptional activator. *J Bacteriol* **183**: 6620-6629.
- Fang, F. C. & S. Rimsky, (2008) New insights into transcriptional regulation by H-NS. *Curr Opin Microbiol* **11**: 113-120.

- Fass, E. & E. A. Groisman, (2009) Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol* **12**: 199-204.
- Feng, X., R. Oropeza & L. J. Kenney, (2003) Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **48**: 1131-1143.
- Galán, J. E. & R. Curtiss, 3rd, (1989) Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 6383-6387.
- Galán, J. E. & H. Wolf-Watz, (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**: 567-573.
- Gao, R., T. R. Mack & A. M. Stock, (2007) Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem Sci* **32**: 225-234.
- García-del Portillo, F., J. W. Foster & B. B. Finlay, (1993) Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun* **61**: 4489-4492.
- Geissmann, T., S. Marzi & P. Romby, (2009) The role of mRNA structure in translational control in bacteria. *RNA Biol* **6**: 153-160.
- González Chávez, R., A. F. Álvarez, T. Romeo & D. Georgellis, (2010) The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J Bacteriol*.
- Goodier, R. I. & B. M. Ahmer, (2001) SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol* **183**: 2249-2258.
- Hansen-Wester, I. & M. Hensel, (2001) *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* **3**: 549-559.
- Hapfelmeier, S. & W. D. Hardt, (2005) A mouse model for *S. typhimurium*-induced enterocolitis. *Trends Microbiol* **13**: 497-503.
- Haraga, A., M. B. Ohlson & S. I. Miller, (2008) *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* **6**: 53-66.
- Haugen, S. P., W. Ross & R. L. Gourse, (2008) Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat Rev Microbiol* **6**: 507-519.
- Hayward, R. D. & V. Koronakis, (2002) Direct modulation of the host cell cytoskeleton by *Salmonella* actin-binding proteins. *Trends Cell Biol* **12**: 15-20.
- Hensel, M., (2000) *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **36**: 1015-1023.
- Hensel, M., (2004) Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* **294**: 95-102.
- Ibarra, J. A. & O. Steele-Mortimer, (2009) *Salmonella*--the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol* **11**: 1579-1586.
- Jones, B. D., (2005) *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *J Microbiol* **43 Spec No**: 110-117.
- Kelly, A., M. D. Goldberg, R. K. Carroll, V. Danino, J. C. Hinton & C. J. Dorman, (2004) A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* **150**: 2037-2053.
- Kim, C. C. & S. Falkow, (2004) Delineation of upstream signaling events in the *Salmonella* pathogenicity island 2 transcriptional activation pathway. *J Bacteriol* **186**: 4694-4704.
- Kiss, T., E. Morgan & G. Nagy, (2007) Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett* **275**: 153-159.

- Lawhon, S. D., R. Maurer, M. Suyemoto & C. Altier, (2002) Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol* **46**: 1451-1464.
- Lenz, D. H., K. C. Mok, B. N. Lilley, R. V. Kulkarni, N. S. Wingreen & B. L. Bassler, (2004) The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* **118**: 69-82.
- Livak, K. J. & T. D. Schmittgen, (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lucchetti-Miganeh, C., E. Burrowes, C. Baysse & G. Ermel, (2008) The post-transcriptional regulator CsrA plays a central role in the adaptation of bacterial pathogens to different stages of infection in animal hosts. *Microbiology (Reading, England)* **154**: 16-29.
- Lundberg, U., U. Vinatzer, D. Berdnik, A. von Gabain & M. Baccarini, (1999) Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol* **181**: 3433-3437.
- Ly, K. T. & J. E. Casanova, (2007) Mechanisms of *Salmonella* entry into host cells. *Cell Microbiol* **9**: 2103-2111.
- Mangan, M. W., S. Lucchini, V. Danino, T. O. Croinin, J. C. Hinton & C. J. Dorman, (2006) The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **59**: 1831-1847.
- Marcus, S. L., J. H. Brumell, C. G. Pfeifer & B. B. Finlay, (2000) *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* **2**: 145-156.
- Martínez, L. C., J. L. Puente & V. H. Bustamante, (2010) The SirA/BarA two-component system activates a regulatory cascade that controls the expression of the SPI-1 and SPI-2 virulence regulons via HilD. Sometido a *Mol Microbiol*.
- Mayer, M. P., (1995) A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**: 41-46.
- McGhie, E. J., L. C. Brawn, P. J. Hume, D. Humphreys & V. Koronakis, (2009) *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol* **12**: 117-124.
- Miao, E. A. & S. I. Miller, (2000) A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7539-7544.
- Miller, S. I., A. M. Kukral & J. J. Mekalanos, (1989) A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5054-5058.
- Mitrophanov, A. Y. & E. A. Groisman, (2008) Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev* **22**: 2601-2611.
- Navarre, W. W., S. Porwollik, Y. Wang, M. McClelland, H. Rosen, S. J. Libby & F. C. Fang, (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**: 236-238.
- Novick, R. P., (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* **48**: 1429-1449.
- Ochman, H., J. G. Lawrence & E. A. Groisman, (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.

- Ochman, H., F. C. Soncini, F. Solomon & E. A. Groisman, (1996) Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7800-7804.
- Olekhovich, I. N. & R. J. Kadner, (2007) Role of nucleoid-associated proteins Hha and H-NS in expression of *Salmonella enterica* activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion. *J Bacteriol* **189**: 6882-6890.
- Padalon-Brauch, G., R. Hershberg, M. Elgrably-Weiss, K. Baruch, I. Rosenshine, H. Margalit & S. Altuvia, (2008) Small RNAs encoded within genetic islands of *Salmonella typhimurium* show host-induced expression and role in virulence. *Nucleic Acids Res* **36**: 1913-1927.
- Patel, J. C. & J. E. Galán, (2005) Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella*- all in the name of entry. *Curr Opin Microbiol* **8**: 10-15.
- Pérez, J. C. & E. A. Groisman, (2009) Evolution of transcriptional regulatory circuits in bacteria. *Cell* **138**: 233-244.
- Picard, F., C. Dressaire, L. Girbal & M. Coccagn-Bousquet, (2009) Examination of post-transcriptional regulations in prokaryotes by integrative biology. *C R Biol* **332**: 958-973.
- Pizarro-Cerda, J. & K. Tedin, (2004) The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. *Mol Microbiol* **52**: 1827-1844.
- Rhen, M. & C. J. Dorman, (2005) Hierarchical gene regulators adapt *Salmonella enterica* to its host milieu. *Int J Med Microbiol* **294**: 487-502.
- Romby, P., F. Vandenesch & E. G. Wagner, (2006) The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression. *Curr Opin Microbiol* **9**: 229-236.
- Romeo, T., (1998) Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol* **29**: 1321-1330.
- Roth, A. & R. R. Breaker, (2009) The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches. *Annu Rev Biochem* **78**: 305-334.
- Santos, R. L., S. Zhang, R. M. Tsohis, R. A. Kingsley, L. G. Adams & A. J. Baumler, (2001) Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect* **3**: 1335-1344.
- Schechter, L. M., S. M. Damrauer & C. A. Lee, (1999) Two AraC/XylS family members can independently counteract the effect of repressing sequences upstream of the *hilA* promoter. *Mol Microbiol* **32**: 629-642.
- Schechter, L. M., S. Jain, S. Akbar & C. A. Lee, (2003) The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU, and Fis affect *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **71**: 5432-5435.
- Schechter, L. M. & C. A. Lee, (2001) AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella typhimurium hilA* promoter. *Mol Microbiol* **40**: 1289-1299.
- Schlumberger, M. C. & W. D. Hardt, (2006) *Salmonella* type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Curr Opin Microbiol* **9**: 46-54.
- Schmidt, H. & M. Hensel, (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **17**: 14-56.
- Sette, M., R. Spurio, E. Trotta, C. Brandizi, A. Brandi, C. L. Pon, G. Barbato, R. Boelens & C. O. Gualerzi, (2009) Sequence-specific recognition of DNA by the C-terminal domain of nucleoid-associated protein H-NS. *J Biol Chem* **284**: 30453-30462.

- Sezonov, G., D. Joseleau-Petit & R. D'Ari, (2007) *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol* **189**: 8746-8749.
- Silphaduang, U., M. Mascarenhas, M. Karmali & B. K. Coombes, (2007) Repression of intracellular virulence factors in *Salmonella* by the Hha and YdgT nucleoid-associated proteins. *J Bacteriol* **189**: 3669-3673.
- Song, M., H. J. Kim, E. Y. Kim, M. Shin, H. C. Lee, Y. Hong, J. H. Rhee, H. Yoon, S. Ryu, S. Lim & H. E. Choy, (2004) ppGpp-dependent stationary phase induction of genes on *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Biol Chem* **279**: 34183-34190.
- Steele-Mortimer, O., (2008) The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. *Curr Opin Microbiol* **11**: 38-45.
- Su, L. H. & C. H. Chiu, (2007) *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J* **30**: 210-219.
- SUIVE, (2010) <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/indice-2009.htm>. Consultado 13 de Junio del 2010.
- Takaya, A., Y. Kubota, E. Isogai & T. Yamamoto, (2005) Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads to downregulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Mol Microbiol* **55**: 839-852.
- Teplitski, M., R. I. Goodier & B. M. Ahmer, (2006) Catabolite repression of the SirA regulatory cascade in *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* **296**: 449-466.
- Thompson, A., M. D. Rolfe, S. Lucchini, P. Schwerk, J. C. Hinton & K. Tedin, (2006) The bacterial signal molecule, ppGpp, mediates the environmental regulation of both the invasion and intracellular virulence gene programs of *Salmonella*. *J Biol Chem* **281**: 30112-30121.
- Tomljenovic-Berube, A. M., D. T. Mulder, M. D. Whiteside, F. S. Brinkman & B. K. Coombes, (2010) Identification of the regulatory logic controlling *Salmonella* pathoadaptation by the SsrA-SsrB two-component system. *PLoS Genet* **6**: e1000875.
- Valdivia, R. H. & S. Falkow, (1997) Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* **277**: 2007-2011.
- Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, A. J. Baumler, S. Falkow, R. Valdivia, W. Brown, M. Le, R. Berggren, W. T. Parks & F. C. Fang, (1999) Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* **401**: 804-808.
- Vogel, J., (2009) A rough guide to the non-coding RNA world of *Salmonella*. *Mol Microbiol* **71**: 1-11.
- Walthers, D., R. K. Carroll, W. W. Navarre, S. J. Libby, F. C. Fang & L. J. Kenney, (2007) The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol* **65**: 477-493.