



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Regulación en cascada de los genes de las islas de patogenicidad 1 y 2 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium a través de los sistemas globales BarA/SirA, Csr y el regulador HlID

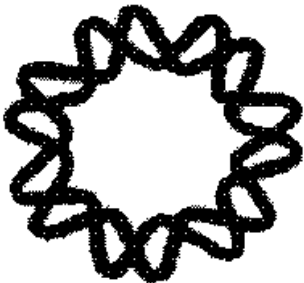
TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA

P R E S E N T A :

M.C LUARY C. MARTÍNEZ CHAVARRÍA

ASESOR:

**DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE
SANTILLÁN**



CUERNAVACA, MORELOS

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dra. Susana López Charretón

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

Dr. José Luis Puente García

Dr. Víctor H. Bustamante Santillán

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Dra. Gloria Soberón Chávez

Dr. Mario Soberón Chávez

Dr. Juan Miranda Ríos

Dr. Edmundo Calva Mercado

Durante el desarrollo de este trabajo recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 169380) y del proyecto de PAPIIT-UNAM IN210309, así como apoyo de los proyectos de PAPIIT-UNAM IN210309 e IN216310 y del proyecto de C-B CONACyT no. 83277 para la realización de mi trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haber sido mi casa desde que empecé mis estudios de preparatoria hace ya varios años. Por haberme brindado todos los recursos para culminar hoy con mi etapa como estudiante. Porque el orgullo de ser parte de ella, es algo que se lleva siempre, dentro y fuera de las aulas.

Al Instituto de Biotecnología, por haberme brindado un posgrado de la más alta calidad en nuestro país. Por facilitar a sus estudiantes todos los recursos académicos para culminar con éxito el posgrado.

A mi asesor y mejor amigo, Víctor Bustamante. Cualquier cosa que pueda plasmar en estas líneas, serán insuficientes para agradecer todo lo que has hecho por mí y para expresarte todo el cariño que te tengo (necesitaría un escrito más largo que esta tesis). Has sido el mejor asesor que haya podido tener y el mejor amigo que pude haber encontrado también. Mi identificación contigo no sólo fue académica, me has sabido guiar en lo profesional y en lo personal; esa identificación hizo que formáramos el mejor equipo para todo. Por el orgullo de ser tu alumna (la primera de doctorado), de tener tu amistad y de nuestros logros, valieron la pena todas las adversidades que hemos tenido que enfrentar. Mis logros hoy, son en gran medida debidos al esfuerzo, dedicación, atención y cariño que pusiste en todo momento en mí. Mi agradecimiento y mi cariño para ti, por siempre.

A José Luis Puente, por haberme abierto las puertas de su laboratorio, y por brindar siempre críticas y comentarios que ponen “la cereza del pastel” (como él dice) en el trabajo que realizamos. Por las palabras que sabe brindar en los momentos de confusión e indecisión. Gracias.

A mis compañeros de laboratorio y a todas las personas que indirectamente contribuyeron a la realización de mi proyecto. Especialmente a Rosalva González, Amapola Blanco, Elvira Villa, Miguel Ángel Trujillo y Raúl Ríos porque hacen fuerte el laboratorio con su trabajo, sin el cual no podríamos sacar adelante nuestros proyectos tan rápido. Y especialmente también a Paola Kuri, porque no hay mejor manera de aprender, que enseñando. Gracias por haber sido parte de mi formación pero sobre todo, por tu amistad y aprecio.

A la Dra. Susana López y el Dr. Miguel Ángel Cevallos, por haber formado parte de mi comité tutorial y porque gracias a ellos crecí académicamente durante estos años. Sin sus críticas y exigencias, mi formación académica no hubiera estado tan enriquecida. Gracias también por los elogios hacia mi trabajo y los consejos amistosos que siempre me brindaron.

A los miembros del jurado, Dra. Gloria Soberón, Dra. Guadalupe Espín, Dr. Mario Soberón, Dr. Juan Miranda y Dr. Edmundo Calva, por las críticas, comentarios y elogios hacia mi trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres, porque siempre me han brindado su apoyo y su confianza, para realizar todas las cosas que yo quiera. Porque constantemente me impulsan a perseguir lo que me haga estar bien conmigo misma y porque siempre han respetado mis decisiones. Por haberme servido de ejemplo desde pequeña. Los amo

A mi hermano Antínoo y familia (Karen y Sahra), porque su existencia hace agradable mi vida. Porque sé que se alegran con mis logros, porque me dan consejos cuando los necesito y me apoyan en todo momento.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARN pol	ARN polimerasa
ATP	Adenosín trifosfato
°C	Grados centígrados
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
cDNA	Cadena complementaria de ADN
DTNB	Ácido 5,5'ditio-bis (2--ácido nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
EMSA	Ensayos de retardamiento en gel de la movilidad electroforética
FT	Fiebre tifoidea
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-ácido piperazinetanosulfónico
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobase
Kd	Constante de disociación
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
MBP	Proteína de unión a maltosa
mg	Miligramo
min	Minuto
μ l	Microlitro
μ m	Micrómetro
μ mol	Micromol
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MM-N	Medio mínimo N
nM	Nanomolar
NLR	Receptores tipo NOD

PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PBS-T	Amortiguador de fosfatos salino con Tween
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Isla de patogenicidad
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
q-RT-PCR	Transcriptasa Reversa-PCR cuantitativo en tiempo real
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SCV	Vacuolas que contienen a <i>Salmonella</i>
SD	Secuencia Shine Dalgarno
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
Sifs	Filamentos inducidos por <i>Salmonella</i>
SNT	Salmonelosis no tifoidea
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
SST3	Sistema de secreción tipo tres
TLRs	Receptores tipo Toll
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Voltios
WT	Cepa silvestre

ÍNDICE GENERAL

Resumen	11
Abstract	12
1. Introducción	13
1.1. El género <i>Salmonella</i> y su importancia	13
1.2. Factores de virulencia de <i>Salmonella</i>	14
1.2.1. Sistemas de secreción tipo tres (SST3)	15
1.2.2. Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i> (SPI)	16
1.2.2.1. SPI-1	17
1.2.2.2. SPI-2	18
1.3. Mecanismo de infección	19
1.4. Modelos animales empleados para el estudio de la salmonelosis	29
1.5. Regulación genética de las SPIs	30
1.5.1. Señales físico-químicas que influyen en la expresión de SPI-1 y SPI-2	30
1.5.2. Reguladores positivos y negativos que controlan la expresión de SPI-1 y SPI-2	32
1.5.2.1. SPI-1	32
1.5.2.2. SPI-2	36
2. Antecedentes	40
3. Hipótesis y objetivos	43
3.1. Hipótesis	43
3.2. Objetivo general	43
3.3. Objetivos particulares	43
3.4. Objetivos específicos	43
4. Metodología	44
4.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	44
4.2. Construcción de plásmidos	44
4.3. Construcción de cepas mutantes y cepas que expresan genes etiquetados con el epítipo FLAG	47
4.4. Ensayos de expresión de las fusiones transcripcionales al gen reportero <i>cat</i>	48
4.5. Inmunodetección de proteínas mediante "Western blot"	49
4.6. Perfil de secreción de proteínas de SPI-1	50
4.7. Expresión y purificación de las proteínas MBP-SirA y MBP-HilD	50
4.8. Ensayos de retardamiento en gel (EMSA's) con ADN	51
4.9. RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR)	53
4.10. Ensayos de retardamiento en gel (EMSAs) con ARN	53
4.11. Ensayos de protección a la ARNasa (RNA footprints)	54
4.12. Extracción de ARN, "Northern blot" y determinación de la vida media de los transcritos	55
4.13. Ensayos de protección a la DNAsa (DNA footprints)	56
4.14. Ensayos de dimerización	56
5. Resultados	68

5.1. Cascada de regulación formada por los sistemas BarA/SirA y Csr, que induce la expresión de los genes SPI-1 y SPI-2 a través de HilD	68
5.1.1. BarA/SirA regula a los genes de SPI-1 y SPI-2 a través de HilD	68
5.1.2. SirA se une a las regiones reguladoras de <i>csrB</i> y <i>csrC</i> pero no a la de <i>hilD</i>	72
5.1.3. SirA controla la expresión de HilD a través de las moléculas de ARN CsrB y CsrC	77
5.1.4. CsrA reprime la expresión de HilD al unirse al transcrito líder de <i>hilD</i>	82
5.2. Regulación de <i>csrB</i> y <i>csrC</i> mediada por SirA e IHF	87
5.3. Secuencias en <i>cis</i> que se requieren para la regulación del operón <i>ssrAB</i> mediada por HilD y H-NS	94
5.3.1. Análisis de la expresión de fusiones transcripcionales que contienen diferentes regiones de la región reguladora de <i>ssrAB</i>	95
5.3.2. Ensayos de interacción de HilD y H-NS con diferentes regiones de <i>ssrAB</i>	102
6. Discusión	106
7. Perspectivas	116
8. Referencias	117
9. Anexo (Artículos publicados)	134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Los inyectisomas del SST3 de <i>Salmonella</i>	16
Figura 2. Mapa de SPI-1	18
Figura 3. Mapa de SPI-2	19
Figura 4. Esquema que muestra los principales pasos durante la infección con <i>Salmonella</i>	22
Figura 5. Regulación de la expresión génica de SPI-1	36
Figura 6. Regulación de la expresión génica de SPI-2	39
Figura 7. SirA induce la expresión de SsrB y <i>hilA</i> a través de HilD	69
Figura 8. SirA induce la expresión de <i>csrB</i> , pero no de <i>hilA</i> , <i>hilC</i> y <i>rtsA</i> en ausencia de HilD	70
Figura 9. SirA y BarA, regulan positivamente la expresión de <i>hilD</i>	71
Figura 10. SirA se une a <i>csrB</i>	73
Figura 11. La fosforilación de SirA es necesaria para inducir la expresión de <i>csrB</i> <i>in vivo</i>	73
Figura 12. SirA se une específicamente a <i>csrB</i>	74
Figura 13. SirA fosforilada se une específicamente a <i>csrC</i> , pero no a <i>hilD</i> , <i>hilA</i> , <i>hilC</i> o <i>ssrAB</i>	75
Figura 14. SirA no fosforilada se une a <i>csrB</i> y <i>csrC</i> , pero no a <i>hilD</i> , <i>hilA</i> , <i>hilC</i> o <i>ssrAB</i>	76
Figura 15. SirA regula positivamente la expresión de <i>csrB</i> y <i>csrC</i>	77
Figura 16. SirA y CsrB/C se requieren para inducir la expresión de <i>hilD</i> y por lo tanto de los genes de SPI-1 y SPI-2	79
Figura 17. La presencia de CsrB restaura la expresión de <i>hilD</i> , <i>hilA</i> y <i>ssaG</i> en ausencia de SirA pero no en ausencia de HilD	80
Figura 18. SirA, pero no HilD, requiere la presencia de CsrB/C para inducir la secreción de proteínas de SPI-1 y la expresión del efector SseB codificado en SPI-2	81
Figura 19. CsrA regula negativamente a <i>hilD</i> , <i>hilA</i> y <i>ssrAB</i>	83
Figura 20. Interacción de CsrA con el ARNm de <i>hilD</i>	86
Figura 21. SirA regula a <i>csrB</i> y requiere para ello la región comprendida entre las posiciones -230 y -170	87
Figura 22. SirA se une a la región de <i>csrB</i> localizada entre las posiciones -230 y -170	88
Figura 23. Secuencia conservada en la región reguladora de <i>csrB</i>	89
Figura 24. Secuencia reconocida por SirA sobre <i>csrB</i>	90
Figura 25. SirA es capaz de dimerizar	91
Figura 26. IHF regula a <i>csrB</i> al unirse directamente a su región reguladora	93
Figura 27. La región comprendida entre las posiciones -302 y +478 de <i>ssrAB</i> , contiene los elementos necesarios para su regulación por HilD y OmpR...	95

Figura 28. Representación esquemática de las fusiones transcripcionales <i>ssrAB-cat</i> derivadas de la fusión +478, que contienen diferentes segmentos de la región reguladora de <i>ssrAB</i>	96
Figura 29. Secuencias reguladoras negativas, requeridas para la regulación de <i>ssrAB</i> mediada por HilD, se encuentran corriente abajo del promotor de <i>ssrAB</i>	97
Figura 30. En medio mínimo no se requiere a HilD para la expresión de <i>ssrAB</i>	97
Figura 31. OmpR se requiere para la expresión de <i>ssrAB</i> en LB, aún en ausencia de la región +478/+10.....	98
Figura 32. OmpR se requiere para la expresión de <i>ssrAB</i> en MM-N, aún en ausencia de la región +478/+10	99
Figura 33. H-NS requiere de la región +478/+10 para reprimir la expresión de <i>ssrAB</i>	100
Figura 34. La secuencia contenida corriente arriba del promotor de <i>ssrAB</i> no es requerida para su regulación mediada por HilD y OmpR	101
Figura 35. Representación esquemática de los fragmentos obtenidos a partir de la región -302/+478, usados en los EMSAs	102
Figura 36. Ensayos de retardamiento tipo EMSA con la proteína MBP-HilD y los fragmentos de ADN 478A-478E de <i>ssrAB</i>	103
Figura 37. Ensayos de retardamiento tipo EMSA con la proteína H-NS-His y los fragmentos de ADN 478A-478E de <i>ssrAB</i>	104
Figura 38. Representación esquemática de las regiones requeridas para la interacción de HilD y H-NS sobre <i>ssrAB</i>	105
Figura 39. Representación esquemática de la cascada reguladora que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 en <i>S. Typhimurium</i>	109
Figura 40. Modelo propuesto para la regulación de <i>csrB</i> por SirA e IHF	112
Figura 41. Esquema que muestra las regiones de <i>ssrAB</i> necesarias para su regulación mediada por HilD, OmpR y H-NS	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo	57
Tabla 2. Plásmidos empleados en este trabajo	58
Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo	63
Tabla 4. Antibióticos y dosis empleadas en este trabajo	67

RESUMEN

Las islas de patogenicidad 1 y 2 de *Salmonella* (SPI-1 and SPI-2) tienen papeles fundamentales en la patogénesis de *Salmonella enterica*. En nuestro grupo hemos visto que cuando *Salmonella* crece en el medio LB, HilD, un regulador transcripcional codificado en SPI-1, induce primero la expresión de *hilA*, localizado en SPI-1 y que codifica el regulador central de esta isla, y subsecuentemente la del operón *ssrAB*, localizado en SPI-2 y que codifica el regulador central de dicha isla. En este trabajo integramos con claridad la cascada de regulación que induce la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 a través del regulador HilD. Demostramos que el sistema de dos componentes BarA/SirA actúa a través del sistema Csr para inducir la expresión de *hilD* y así inducir la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2. CsrA, una proteína reguladora de unión a ARN, regula postranscripcionalmente la expresión de *hilD* al unirse a sitios que se sobreponen a la secuencia Shine-Dalgarno y el sitio de inicio de la traducción del ARNm de *hilD*, con lo que evita su traducción y favorece que este ARNm sea degradado. BarA/SirA activa directamente la expresión de CsrB y CsrC, dos ARNs no traducidos que secuestran a CsrA, contrarrestando así la represión que ejerce esta proteína en *hilD*. Así mismo, en este trabajo definimos un modelo para la regulación de la expresión de *csrB*, que involucra la acción concertada de los reguladores positivos SirA e IHF. Específicamente, determinamos que SirA reconoce la secuencia palindrómica 5'-TGTGAGAGATCTCTTACA -3' localizada entre las posiciones -173 y -190, con respecto al inicio de la transcripción de *csrB*, mientras que IHF reconoce la secuencia 5'-AAACAATAATTAATAA -3' localizada entre el sitio de unión de SirA y el promotor de *csrB*, entre las posiciones -90 y -105. Con base en esto y en estudios previos acerca del papel que juega IHF en regulación transcripcional, proponemos que la unión de SirA no es suficiente para la expresión de *csrB*, dada la lejanía de su sitio de unión con respecto al promotor, por lo que se requiere que IHF se una en *csrB*, induciendo un doblamiento en el DNA que posiciona a una distancia y orientación adecuada a SirA para que pueda favorecer la interacción de la RNA polimerasa al promotor. Estos resultados además de definir con mayor detalle el mecanismo de regulación de *csrB* por SirA e IHF, integran a IHF como un regulador más de la cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2. Por otro lado, en este trabajo localizamos secuencias de regulación importantes para la expresión de *ssrAB*, y así de los genes de SPI-2, mediada por HilD, H-NS y OmpR. Determinamos que la región -106/+10 de *ssrAB* se requiere para su regulación mediada por OmpR, mientras que la región +10/+478, localizada corriente abajo de su promotor, se requiere para su regulación mediada por HilD y H-NS. En ausencia de la región +10/+478, requerida para el control negativo de *ssrAB* mediado por H-NS, ya no se requiere a HilD para la expresión de este operón pero sí a OmpR, lo cual sugiere que HilD actúa como un anti-represor de H-NS, mientras que OmpR actúa como un activador clásico, en la inducción de la expresión de *ssrAB*. Nuestros resultados amplían, de manera importante, el conocimiento actual acerca de los mecanismos moleculares que coordinan la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 de *Salmonella*. Así mismo, nuestros resultados ilustran cómo múltiples reguladores globales y específicos han sido integrados durante la evolución de *Salmonella* para formar una compleja red de regulación, que controla la apropiada expresión espacio-temporal de los genes de virulencia de esta bacteria, lo cual define en gran medida el nicho específico donde establece una infección en sus hospedadores.

ABSTRACT

Salmonella pathogenicity islands 1 and 2 (SPI-1 and SPI-2) have essential roles in the pathogenesis of *Salmonella enterica*. Previously, we showed that when *Salmonella* grows in LB medium, HilD, a transcriptional regulator encoded in SPI-1, first induces the expression of *hilA*, which is located in SPI-1 and codes the central positive regulator of this island, and then induces the expression of *ssrAB*, which is located in SPI-2 and codes the central positive regulator of this island. In this work, we clearly integrated the regulatory cascade that induces the expression of SPI-1 and SPI-2 genes through HilD. We demonstrated that the two-component system BarA/SirA acts through the Csr system to induce the expression of *hilD* and thus induce the expression of SPI-1 and SPI-2 genes. CsrA, a RNA-binding regulatory protein, controls the *hilD* expression postranscriptionally, by binding to sites overlapping the Shine-Dalgarno sequence and the translational start site of the *hilD* RNAm, thus preventing the *hilD* translation and favoring the degradation of this RNAm. BarA/SirA directly activates the expression of CsrB and CsrC, two non-translated RNAs that sequester CsrA, thus counteracting the repression exerted by CsrA on *hilD*. Likewise, in this work we defined a model for the regulation of *csrB* expression, which involves the concerted action of the positive regulators SirA and IHF. Specifically, we determined that SirA recognizes the palindromic sequence 5'-TGTGAGAGATCTCTTACA -3', located between positions -172 and -190, relative to the transcription start site of *csrB*, while IHF recognizes the sequence 5'-AAACAATAATTAATA -3', located between the SirA binding site and the *csrB* promoter, between positions -89 and -105. Based on our results and previous studies about the role of IHF as transcriptional regulator, we propose that IHF binding to *csrB* induces a local DNA bending that places the SirA bound far upstream the promoter in an appropriated distance and orientation, which favor the SirA-mediated interaction of the RNA pol on the *csrB* promoter. Besides to define in more detail the mechanism by which SirA and IHF regulate *csrB*, these results integrate IHF as another regulator involved in the regulation cascade that controls the expression of SPI-1 and SPI-2 genes. On the other hand, in this work we defined important *cis*-acting regulatory sequences for the expression of *ssrAB*, and thus SPI-2 genes, mediated by HilD, H-NS and OmpR. We determined that the region -48/+10 of *ssrAB* is required for its OmpR-mediated regulation, while the region +10/+478, downstream the *ssrAB* promoter, is required for its HilD- and H-NS-mediated regulation. In absence of the region +10/+478, which is required for the H-NS-mediated negative control of *ssrAB*, HilD is not required for the expression of *ssrAB*; in contrast, OmpR is still required, which suggests that HilD acts as a derepressor of H-NS, while OmpR acts as a classical activator for the *ssrAB* expression. Our results considerably expand the current knowledge about the molecular mechanisms that coordinate the expression of *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 genes. Likewise, our results illustrate how multiple global and specific regulators have been integrated during the evolution of *Salmonella* to constitute a complex regulation network that controls the appropriate spatio-temporal expression of virulence genes in *Salmonella*, which defines the specific niche where *Salmonella* establish an infection in its hosts.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El género *Salmonella* y su importancia

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, vasto grupo heterogéneo de bacilos Gram negativos cuyo hábitat natural es el intestino de humanos y animales. Las bacterias del género *Salmonella* son patógenos ubicuos que pueden infectar una gran variedad de mamíferos, aves, reptiles e insectos.

La taxonomía de *Salmonella* ha sido muy compleja puesto que ha sufrido muchas modificaciones, con esquemas de clasificación basados en su epidemiología, variedad de hospedadores, diferencias serológicas y reacciones bioquímicas. En el año 2005 se aprobó que el género *Salmonella* consta de tres especies: *Salmonella bongori*, *Salmonella subterranea* y *Salmonella enterica*. Esta última comprende a su vez 6 subespecies: I, “*enterica*”; II, “*salamae*”; IIIa, “*arizonae*”; IIIb, “*diarizonae*”; IV, “*houtenae*” y VI, “*indica*”. A su vez, cada subespecie se ha dividido tradicionalmente en serotipos, de acuerdo a la clasificación de Kauffman-White, la cual se basa en antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (Vi) (Brenner *et al.*, 2000). Más del 60% de los 2,541 serotipos identificados hasta ahora pertenecen a la subespecie *enterica*, en la cual se encuentra el 99% de los serovares responsables de causar enfermedades en animales (Brenner *et al.*, 2000).

Salmonella puede ocasionar dos cuadros clínicos en humanos: fiebre tifoidea (FT), causada por *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), y gastroenteritis (salmonelosis no tifoidea, SNT), la cual es la más común de las infecciones y es causada por varios serotipos (García-del Portillo, 2001; Levine *et al.*, 2001). En México, los serotipos aislados más frecuentemente como causa de gastroenteritis son *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) y *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000). Existen marcadas diferencias clínicas entre la FT y la SNT. Mientras que la SNT comienza después de un periodo de incubación corto (12-72 hs), es de corta duración (<10 días), se restringe al intestino y linfonodos mesentéricos y es fácilmente combatida por el sistema inmune, la FT tiene un período de incubación considerablemente largo (5-9 días), dura más (la fiebre puede durar hasta 3 semanas), produce infección sistémica que

puede diseminarse a hígado, bazo y médula ósea además del intestino y linfonodos y puede persistir por mucho tiempo en el hospedador, indicando que los serotipos involucrados pueden evadir el sistema inmune de manera más eficiente (Raffatellu *et al.*, 2008b).

Las infecciones con *Salmonella* ocurren en varios países del mundo, produciendo pérdidas económicas considerables en la economía pecuaria de los mismos. Estas infecciones cobran aún más importancia por el riesgo que representan para la salud pública, puesto que son una de las principales causas de enfermedades entéricas en el ser humano. La OMS ha reportado que anualmente existen de 16 a 21 millones de casos de fiebre tifoidea, con 200,000 a 600,000 muertes, y 93.8 millones de casos de gastroenteritis y diarreas debidas a salmonelosis no tifoideas, que producen 155,000 muertes anuales, siendo éstas últimas las infecciones de origen alimentario más comunes a nivel mundial (Bhan *et al.*, 2005; Majowicz *et al.*, 2010). En México, durante el año pasado (2010) se reportaron 44,756 casos de fiebre tifoidea y 119,374 casos de salmonelosis no tifoideas, siendo los estados de Chiapas, Coahuila, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz, los de mayor número de casos reportados (CENAVECE, noviembre 2011).

1.2. Factores de virulencia de *Salmonella*

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

Dentro de los factores de virulencia con los que cuenta *Salmonella* para colonizar a sus hospedadores y establecer una infección exitosa se encuentran el LPS, toxinas,

fimbrias, sistemas de secreción y proteínas efectoras, los cuales se codifican tanto en el cromosoma bacteriano como en plásmidos.

1.2.1. Sistemas de secreción tipo tres (SST3)

Son organelos complejos compuestos por más de 20 proteínas, presentes en varias especies de bacterias Gram negativas. Estas proteínas se ensamblan para formar una estructura supramolecular conocida como el complejo de aguja o inyectisoma. Micrografías electrónicas de SST3 purificados han revelado que el inyectisoma consiste de una base de múltiples anillos que atraviesan las membranas interna y externa de la envoltura bacteriana, un tubo interno que une los anillos y una aguja hueca (Kubori *et al.*, 1998) (Figura 1). El propósito biológico del SST3 es llevar a cabo la interacción con las células hospedadoras, ya que a pesar de llamarse “sistema de secreción”, su principal función no es la secreción de proteínas al medio extracelular, sino la translocación de éstas desde el citosol bacteriano hasta el interior de las células del hospedador, funcionando así como una “jeringa molecular” (Schmidt y Hensel, 2004). Las proteínas efectoras así “inyectadas” son capaces de modificar diversas rutas de transducción de señales e inducir re-arreglos del citoesqueleto en las células hospedadoras.

El SST3 es exclusivo de bacterias Gram negativas y está presente en gran variedad de especies, en las que lleva a cabo funciones que van desde efectos antifagocíticos y citotóxicos en las células hospedadoras, invasión de las células hospedadoras y patogénesis intracelular, hasta el establecimiento de relaciones simbióticas (Kuhle y Hensel, 2004).

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

Salmonella posee dos SST3, cada uno codificado en una de las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI-1 y SPI-2, respectivamente), a través de los cuales inyecta distintas proteínas efectoras a las células hospedadoras, en diferentes etapas de la patogénesis de esta bacteria, como se verá más adelante.

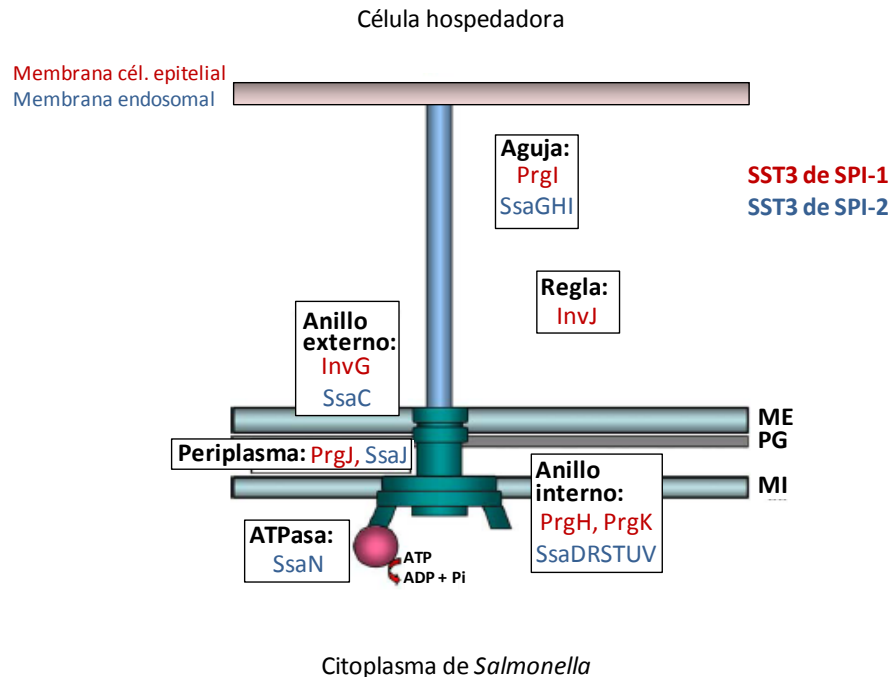


Figura 1. Los inyectisomas del SST3 de *Salmonella*. El esquema muestra la aguja protruyendo de la membrana bacteriana y el cuerpo basal que abarca la membrana externa (ME), la capa de peptidoglicano (PG) y la membrana interna (MI) de la bacteria. Se indican los constituyentes de los inyectisomas cuya localización es conocida. Se señalan en rojo los componentes que se conocen para el SST3 de SPI-1 y en azul los componentes que se conocen para el SST3 de SPI-2.

1.2.2. *Islas de patogenicidad de Salmonella (SPI, de Salmonella Pathogenicity Island)*

Son regiones particulares del genoma de *Salmonella* en las que se encuentran codificados muchos de los genes necesarios para su virulencia. En general, las islas de patogenicidad (PI, de Pathogenicity Islands) son regiones de entre 10 a 200 Kb, contienen genes de virulencia y se encuentran en bacterias patógenas pero están ausentes en bacterias no patógenas. La presencia en estas islas de genes funcionales o crípticos que codifican factores de movilidad, tales como integrasas y transposasas, de diferentes secuencias de inserción que las flanquean, así como de su contenido de G+C, que es distinto al del resto del genoma que las contiene, sugiere que éstas se adquieren mediante eventos de transferencia horizontal. Su inserción en los genomas se da

frecuentemente en genes que codifican para ARNs de transferencia (ARNt) (Hacker y Kaper, 2000).

Hasta ahora se han reportado más de 10 SPIs; algunas se conservan entre los miembros del género *Salmonella*, mientras que otras son específicas de ciertos serotipos. Además, existen otras regiones cromosomales con características de islas, pero sin una función clara en la patogénesis de *Salmonella* (Ochman y Groisman, 1996; Marcus *et al.*, 2000).

SPI-1 y SPI-2 son las SPIs más estudiadas en *Salmonella*; ambas codifican un SST3, así como varias proteínas efectoras y chaperonas que son esenciales en diferentes etapas de la infección y que son translocadas hacia la célula hospedadora mediante el correspondiente SST3 codificado en cada SPI.

1.2.2.1. SPI-1

Esta isla se encuentra presente en *S. bongori* y todos los serotipos de *S. enterica*; se cree que fue adquirida en la evolución temprana de *Salmonella*, cuando éste género se separó de *Escherichia* (Hensel, 2004). SPI-1 comprende aproximadamente 40 kb y contiene al menos 39 genes que codifican los componentes del SST3, las proteínas efectoras que son translocadas a través de éste, proteínas chaperonas y proteínas involucradas en la regulación de la expresión de los genes de la isla.

El papel primordial de SPI-1 se da durante las primeras etapas de la infección por *Salmonella*, es decir, cuando la bacteria se encuentra en el lumen del intestino. Las proteínas codificadas en esta isla contribuyen a la invasión de la bacteria a las células del hospedador y a la respuesta inflamatoria intestinal (Galán y Curtís, 1989; Santos *et al.*, 2003). Dentro de estas proteínas están incluidas AvrA, SipA, SipB, SipC, SipD, SopA, SopB/SigD, SopD, SopE, SopE2, SptP y SlrP (Ly y Casanova, 2007). Algunas de éstas se encuentran codificadas fuera de SPI-1 pero forman parte del regulón de SPI-1 y son translocadas por el SST3 codificado en esta isla (Ellermeier y Slauch, 2007).

El SST3 se encuentra codificado en los operones *prg/org* así como en los operones *inv/spa*, mientras que los operones *sic/sip* codifican las proteínas efectoras y sus chaperonas (Lostroh y Lee, 2001b) (Fig. 2). Los genes *hilA*, *hilC* y *hilD* codifican proteínas involucradas en la regulación de la expresión de los genes de la isla.

SPI-1

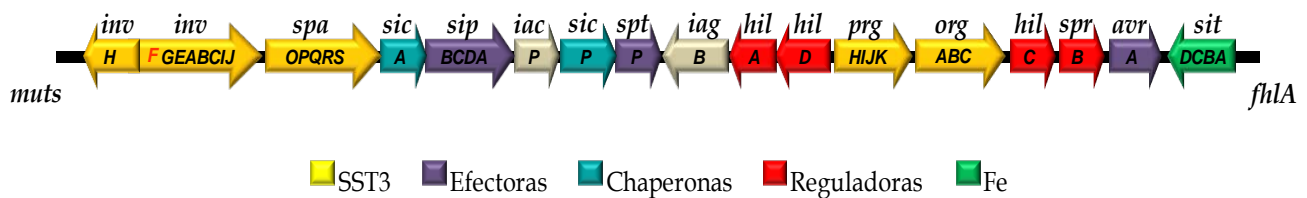


Figura 2. Mapa de SPI-1.

1.2.2.2. SPI-2

Esta isla tiene un tamaño de 40 Kb, contiene 44 genes y se ha dividido en dos segmentos, los cuales se estima fueron obtenidos en diferentes eventos de transferencia horizontal (Hensel *et al.*, 1999) (Fig. 3). Un fragmento de 14.5 Kb, presente en *S. bongori* y *S. enterica*, contiene los genes *ttr* que codifican una tetracionato reductasa y el sistema de dos componentes que regula la expresión de ésta. Aunque estos genes no son esenciales para la virulencia, se ha demostrado que la presencia de tetracionato como aceptor de electrones capacita a la bacteria para emplear etanolamina como fuente de carbono en condiciones de anaerobiosis (Hensel *et al.*, 1999; Hensel, 2000; Thiennimitr *et al.*, 2011). El otro fragmento, de 25 kb y presente sólo en *S. enterica*, contiene los genes necesarios para la virulencia de *Salmonella* agrupados en al menos 4 operones: *ssa*, *ssc*, *sse* y *ssr* (Marcus *et al.*, 2000). El primero incluye los genes *ssaBCDEGHIJJKLMVN-U*, que codifican el aparato del SST3. Los genes *ssc* codifican las proteínas chaperonas del SST3 y los genes *sse* codifican las proteínas efectoras del sistema. Estos dos grupos de genes se transcriben como un solo operón. El operón *ssrAB* codifica las proteínas que regulan la expresión del resto de los genes de SPI-2 (Hensel, 2000).

Los genes de la SPI-2 se requieren principalmente para la sobrevivencia intracelular de *Salmonella* y su replicación dentro de los macrófagos, y por lo tanto, para el establecimiento de la infección sistémica (Ochman *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996; Hensel *et al.*, 1998). Las proteínas translocadas a través del SST3 de esta isla interfieren con el tráfico de oxidasas NADPH hacia las vacuolas de *Salmonella* (SCV) y evitan, por

tanto, la exposición de *Salmonella* hacia especies reactivas tóxicas de oxígeno que tienen como finalidad destruir a la bacteria (Vazquez-Torres y Fang, 2001).

Sin embargo, los genes de la SPI-2 no sólo son importantes durante la fase intracelular de *Salmonella*, ya que se ha reportado que también son necesarios para el desarrollo de una enfermedad intestinal completa y se expresan desde que la bacteria está en el lumen intestinal, antes de la invasión celular (Brown *et al.*, 2005; Coburn *et al.*, 2005; Coombes *et al.*, 2005a).

SPI-2

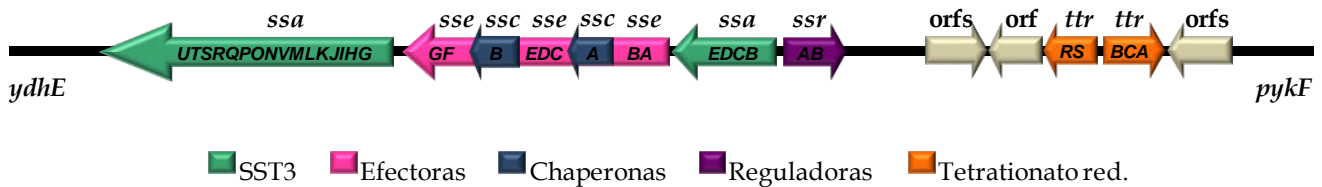


Figura 3. Mapa de SPI-2.

1.3. Mecanismo de infección

En la figura 4 se ilustran los principales eventos que se llevan a cabo durante la patogénesis de las infecciones con *Salmonella*.

Los hospedadores de *Salmonella* adquieren la infección por vía oral, al ingerir agua o alimentos contaminados con esta bacteria. Una gran proporción de organismos ingeridos son destruidos por el pH bajo del estómago, pero aquellas bacterias que sobreviven pueden llegar al epitelio intestinal (Figura 4). Aunque no siempre es considerado, una gruesa capa de moco que contiene mucina, IgA y péptidos antimicrobianos, recubre el epitelio intestinal y representa un reto significativo para las bacterias que necesitan atravesar esta barrera para tener contacto con el epitelio, al cual se adhieren mediante diferentes fimbrias, siendo esto un paso importante para colonizar el íleon del intestino delgado el mismo día de la ingestión (Ahmer y Gunn, 2011).

El genoma de cada serotipo del género *Salmonella* codifica diferentes tipos de fimbrias, entre las que se encuentran *fim* (fimbria tipo I), *pef* (plasmid-encoded fimbriae),

stf (*S. typhimurium* fimbriae), *bcf* (bovine colonization factor), *saf* (*Salmonella* fimbriae) y *lpf* (long polar fimbriae). Se ha propuesto que cada fimbria es requerida únicamente para la adhesión e invasión de una línea celular individual (Baumler *et al.*, 1996), lo que podría explicar la especificidad de algunos serotipos de *Salmonella* por un hospedador en particular.

Salmonella se adhiere a los enterocitos del íleon y a las células M de las placas de Peyer que, debido a la ausencia del borde de cepillo, así como de glucocálix, representan una vía ideal para la invasión que realiza esta bacteria al epitelio intestinal. Mientras que estas células parecen ser el sitio primario de entrada en el modelo murino, en el modelo bovino tanto los enterocitos como las células M son invadidos por *Salmonella* (Frost *et al.*, 1997).

Después del primer contacto, *Salmonella* transloca las proteínas efectoras SopB, SopE, SopE2, SipA y SipC desde su citoplasma hasta el citosol de las células del epitelio intestinal a través del SST3 codificado en SPI-1. Estas proteínas actúan como cinasas, fosfatasas, proteínas de unión a actina (para inducir su polimerización o inhibir su despolimerización) o activadoras de GTPasas moduladoras del citoesqueleto, por lo que una vez en el citosol, promueven cambios en el citoesqueleto de las células epiteliales, lo cual permite la formación y mantenimiento de proyecciones membranales, que median la internalización bacteriana en estas células. Este proceso es conocido como endocitosis mediada por bacterias (Francis *et al.*, 1993; Ginocchio *et al.*, 1994) (Figura 4).

SopE, SopE2 y SopB activan las GTPasas de la familia Rho, incluyendo Cdc42, Rac y RhoG, las cuales son moduladoras del citoesqueleto de actina (Bakshi *et al.*, 2000; Stender *et al.*, 2000; Friebel *et al.*, 2001; Haraga *et al.*, 2008). Mientras que SopE y SopE2 se comportan como “factores intercambiadores de guanina” (GEF, guanine exchange factor) para las 3 GTPasas, SopB sólo estimula Cdc42 y RhoG indirectamente, a través de su actividad fosfoinositol fosfatasa (Haraga *et al.*, 2008). La activación de las GTPasas Rho provoca el reclutamiento y activación de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP), tales como proteínas de la familia SCAR (supresor of cAMP receptor)/WAVE (WASP-family verprolin homology protein) y WAVE2, lo cual promueve la polimerización y nucleación de actina mediante la activación del complejo Arp2/3 (actin-related protein2/3) (Criss y Casanova, 2003; Haraga *et al.*, 2008).

SipC se une a los filamentos de actina y provoca la polimerización de ésta, lo cual resulta en los rearrreglos del citoesqueleto (Hayward *et al.*, 1999; Zhou y Galán, 2001). Por otro lado, SipA se une directamente a filamentos de actina e inhibe su despolimerización (Zhou *et al.*, 1999a; Zhou *et al.*, 1999b). Por lo tanto, SipA puede incrementar la estabilidad de los haces de actina que dirigen y mantienen las proyecciones de la membrana y los filopodios que finalmente englobarán e internalizarán a la bacteria. Aunque SipA y SipC pueden actuar en concierto con SopB, SopE y SopE2 para mediar los cambios en el citoesqueleto, lo que lleva a la formación de las proyecciones membranales, SipA y SipC no pueden inducir dichos cambios ni por tanto la invasión, por sí solas, mientras que SopB, SopE y SopE2 parecen ser esenciales para la invasión (Haraga *et al.*, 2008).

Una barrera importante que *Salmonella* tiene que librar al llegar al intestino es la representada por la microbiota intestinal, conformada por un estimado de 10-100 trillones de microorganismos de al menos 160 especies bacterianas. Entre los muchos beneficios que proporcionan al hospedador en el que habitan, se encuentra el de dar protección contra agentes patógenos, fenómeno conocido como “resistencia a la colonización”, lo cual logran compitiendo por el espacio y los nutrientes, así como produciendo bacteriocinas, toxinas que actúan de manera similar a los péptidos antimicrobianos pero que son producidas por la microbiota y no por el hospedador (Sánchez *et al.*, 2010). Sin embargo, durante la diarrea inflamatoria que se produce durante una infección, la disponibilidad de nutrientes se reduce dramáticamente. Una ventaja que tiene *Salmonella* sobre la microbiota intestinal, es su capacidad para emplear nutrientes generados durante la inflamación, como la etanolamina, que se origina a partir de la fosfatidiletanolamina presente en las membranas de los enterocitos que son dañados durante la infección. A diferencia de la microbiota intestinal, *Salmonella* puede emplear la etanolamina como fuente de carbono en presencia de tetratoato como aceptor de electrones, lo cual la capacita para sobrevivir y replicarse en condiciones de anaerobiosis (Thiennimitr *et al.*, 2011).

Por otro lado, la microbiota intestinal también resulta de ayuda para *Salmonella*, pues produce ácidos grasos de cadena corta como subproductos de su metabolismo, que representan señales ambientales que dirigen a *Salmonella* hacia el íleon distal para llevar a cabo la invasión (Ahmer y Gunn, 2011).

PATOGÉNESIS DE LA SALMONELOSIS

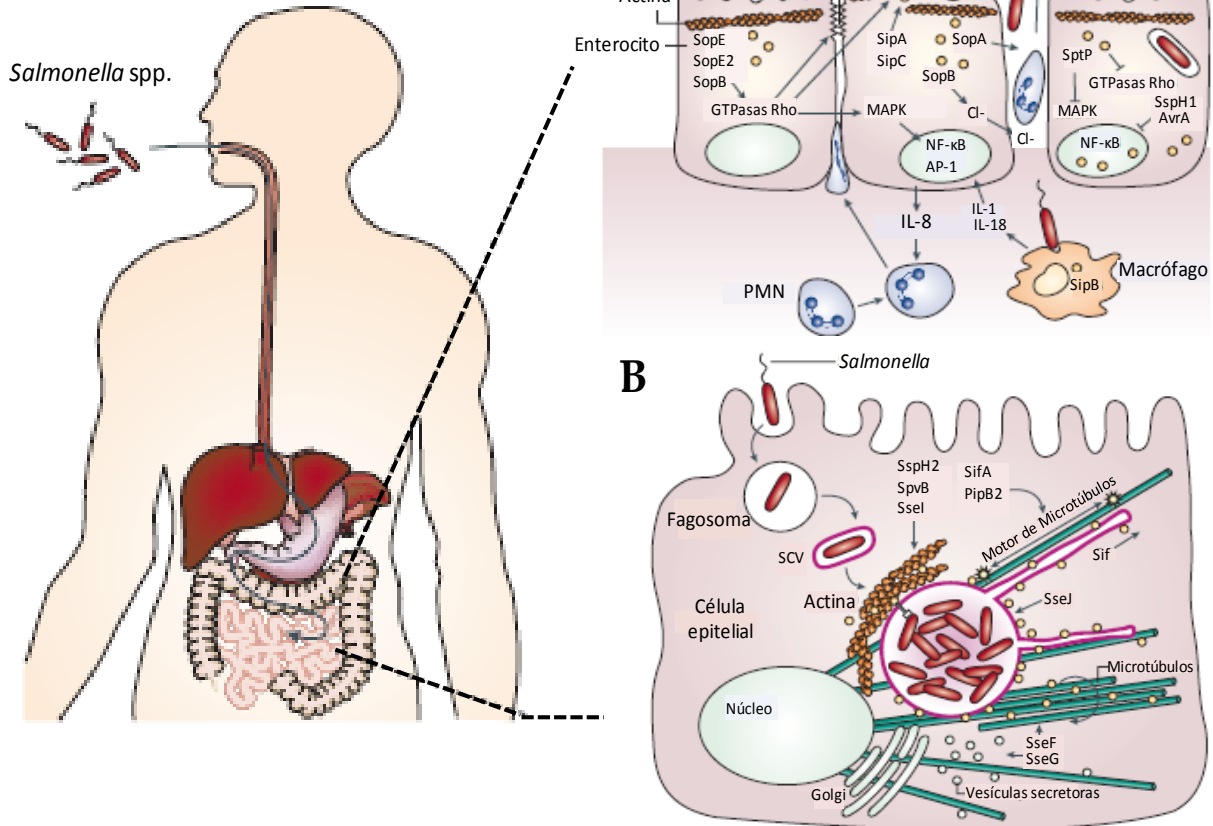


Figura 4. Esquema que muestra los principales pasos durante la infección con *Salmonella*. Las bacterias que ingresan por vía oral y sobreviven al pH ácido del estómago, llegan al epitelio intestinal. Los serotipos no-tifoideos inducen una respuesta local inflamatoria, la cual resulta en la infiltración de neutrófilos al lumen intestinal y diarrea. Los serotipos asociados con enfermedad sistémica entran a los macrófagos intestinales y se diseminan a través del sistema retículoendotelial. **A. Cambios inducidos por el SST3 de SPI-1 en la célula hospedadora.** Al contactar a la célula intestinal, se ensambla el SST3 de SPI-1 y transloca proteínas efectoras (círculos amarillos) al citoplasma de la célula eucariote que inducen cambios en el citoesqueleto de actina, lo cual lleva a la internalización de la bacteria y a la inducción de múltiples cascadas de señalización intracelular por parte de la célula hospedadora (ver el texto). **B. Formación de las SCV e inducción del SST3 de SPI-2 dentro de la célula hospedadora.** Una vez que cruzan el intestino, la bacteria queda englobada en una vacuola conocida como SCV (*Salmonella*-containing vacuole), dentro de la cual se induce el SST3 codificado en SPI-2. A través de éste la bacteria transloca proteínas efectoras que inducen cambios intracelulares que mantienen la estabilidad de las SCV y favorecen la sobrevivencia y replicación de la bacteria (ver el texto).

Se han identificado diversos mecanismos por los cuales las interacciones directas entre la bacteria y las células hospedadoras dan como resultado la producción de citocinas proinflamatorias. Estos incluyen además de la translocación de proteínas efectoras por los SST3, la detección mediante los llamados “receptores de reconocimiento de patrones” (PRRs, Pattern Recognition Receptors), de productos bacterianos denominados “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs, de Pathogen Associated Molecular Patterns), entre los que se encuentran el LPS, el peptidoglicano y la flagelina (Ahmer y Gunn, 2011). Los PRRs más relevantes son los receptores tipo Toll (TLRs) y los receptores tipo NOD (NLRs) (Prost *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2009).

Una vez que *Salmonella* está en contacto con las células hospedadoras, se inicia una respuesta inflamatoria debido a la liberación de quimiosinas de las células afectadas, así como a la liberación de citocinas proinflamatorias debido al contacto con el LPS de la pared celular bacteriana, que actúa como un potente agonista de los TLR4. Se ha demostrado que *Salmonella* es incapaz de colonizar el intestino murino en ausencia de inflamación, ya que la inflamación inducida por la bacteria altera la flora normal y esto favorece el crecimiento del patógeno al reducir la llamada “resistencia a la colonización” (Ahmer y Gunn, 2011). Esto indica que la penetración profunda de la bacteria en la mucosa intestinal es una consecuencia, más que una causa, de la inflamación, ya que la presencia de inflamación severa es común en ausencia de bacterias (Coburn *et al.*, 2005).

Actualmente existen dos hipótesis para explicar el mecanismo que lleva a la atracción de neutrófilos hacia la mucosa intestinal. Una menciona que esto se da como consecuencia de la translocación de las proteínas efectoras de *Salmonella* a las células intestinales a través del SST3 de SPI-1, las cuales como se explicará más adelante, llevan a la producción de quimioatrayentes para los neutrófilos. Otra hipótesis propone un papel más pasivo para el patógeno, y menciona que la invasión bacteriana estimula las vías innatas de inflamación debido a que los PAMPs de *Salmonella* son reconocidos por los PRRs presentes en las células de la lámina propia intestinal. A la fecha se acepta que ambas vías podrían estar actuando *in vivo* para inducir la respuesta inflamatoria por parte de *S. Typhimurium* (Tükel *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha reportado que la migración de neutrófilos hacia el lumen intestinal incrementa la cantidad de bacterias presentes en el lumen, debido a que se oxidan compuestos endógenos como el tiosulfato y se genera tetrationato, compuesto que *Salmonella* puede emplear como aceptor de electrones para

crecer en un ambiente anaeróbico como el que se genera dentro de un intestino inflamado (Thiennimitr *et al.*, 2011).

En conjunto, las proteínas SipA, SopA, SopB, SopD, SopE y SopE2, translocadas por el SST3 de SPI-1, inducen la diarrea y la respuesta inflamatoria en las infecciones por *Salmonella*, mediando la secreción de fluidos al aumentar la secreción de cloro y estimular la migración transepitelial de los neutrófilos (Figura 4) (Galyov *et al.*, 1997; Norris *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002).

SopB, con su actividad de inositol fosfato fosfatasa, media la secreción de fluidos al aumentar la secreción de cloro como consecuencia de la hidrólisis del fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PI3), que es un inhibidor de la secreción de cloro dependiente de calcio (Galyov *et al.*, 1997; Wood *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 2001). Además, su actividad produce 1,4,5,6-tetrakisfosfato, una molécula que induce la secreción de cloro (Norris *et al.*, 1998). SopD tiene un efecto aditivo al de SipB. Las proteínas SipA y SopA están involucradas en la inducción de migración transepitelial de los neutrófilos (Lee *et al.*, 2000).

La estimulación de Cdc42 por SopE, SopE2 y SopB activa la vía de las MAPquinas (MAPK), lo que resulta en la inducción de la proteína activadora de factores de transcripción (AP-1) y el factor nuclear- κ B (NF- κ B) (Eckmann *et al.*, 1993; Haraga *et al.*, 2008). Estos factores de transcripción dirigen la producción de citocinas proinflamatorias, como interleucina 8 (IL-8), un factor quimiotáctico para los neutrófilos. El papel de la IL-8 consiste en reclutar a los neutrófilos hacia el espacio subcelular. Posteriormente, otro quimioatrayente conocido como PEEC (pathogen-elicited epithelial chemoattractant), induce la migración transepitelial de estas células (McCormick *et al.*, 1998).

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

De manera interesante, poco después de la invasión bacteriana, *Salmonella* restaura la estructura normal del citoesqueleto a través de otra proteína efectora

translocada por el SST3 de SPI-1, SptP. Esta revierte los rearrreglos del citoesqueleto provocados por SopE y SopE2, al desactivar a las GTPasas Cdc42 y Rac1 (Fu y Galán, 1998). Los efectos opuestos de estas efectoras están mediados por su regulación temporal, ya que SopE tiene una vida media menor en las células eucariotas que SptP, lo cual favorece su ubiquitinación y rápida degradación (Haraga *et al.*, 2008). SptP también revierte la cascada de señalización proinflamatoria que está asociada a la invasión; esto lo hace bloqueando la activación de las MAPK mediante su actividad de tirosin fosfatasa (Figura 4) (Haraga *et al.*, 2008). Así mismo, *Salmonella* puede revertir la producción de IL-8 después de la invasión, y en esto participan, además de SptP, las proteínas AvrA (de SPI-1) y SspH1 (de SPI-2), que inhiben la expresión génica dependiente de NF- κ B (Figura 4) (Haraga *et al.*, 2008).

De acuerdo al estado inmunológico del hospedador y al serotipo de *Salmonella* que esté infectándolo, el proceso de infección es detenido en esta etapa o puede continuar hacia una infección sistémica. Una diferencia importante entre las SNT y la FT es la respuesta del hospedador en la mucosa intestinal, ya que la primera produce una enfermedad diarreica típica caracterizada por inflamación exudativa e infiltrado de neutrófilos, mientras que en la segunda se presenta diarrea sólo en un tercio de los casos y está caracterizada por una respuesta inflamatoria con exudado mononuclear (Zhang *et al.*, 2003). Debido a esto se ha sugerido que los neutrófilos tienen un papel muy importante en la diarrea inducida por *S. Typhimurium*, y en la inducción de la respuesta inmune para eliminar al patógeno. Esto explica porqué *S. Typhi*, que no induce la respuesta inflamatoria típica por parte del hospedador (atracción de neutrófilos), produce una infección muy invasiva e indica que *S. Typhi* puede evadir los mecanismos de respuesta inmune innata. Se ha reportado que este serotipo expresa mecanismos de virulencia que regulan negativamente la respuesta del hospedador mediada por PRR (específicamente a través de estimulación de TLR5). Aunado a esto, una infección con *S. Typhi* presenta una marcada reducción en la producción de IL-8, la cual es un potente quimioatrayente de neutrófilos; por tanto todo esto resulta en la ausencia de migración de neutrófilos y de diarrea inflamatoria (Raffatellu *et al.*, 2005; Raffatellu *et al.*, 2008b). Durante una infección bacteriana sistémica, generalmente los leucocitos producen más intermediarios reactivos de oxígeno; sin embargo, se ha demostrado que otra de las

respuestas dependientes de TLRs que son evadidas por *S. Typhi* es la de generar el estallido oxidativo durante la interacción con los fagocitos.

Salmonella es un patógeno intracelular facultativo que puede sobrevivir y multiplicarse en el interior tanto de los fagocitos profesionales como de las células no fagocíticas. Dentro de las células, la bacteria empieza a replicarse dentro de una vacuola (*Salmonella*-containing vacuole; SCV) que se formó con su internalización y que contiene concentraciones limitantes de magnesio y hierro, y un pH moderadamente ácido (García del Portillo, 2001; Hansen-Wester y Hensel, 2001). La sobrevivencia intracelular es debida a que la bacteria transloca varias proteínas efectoras hacia el citosol de la célula hospedadora a través de la membrana de las SCV, mediante el segundo SST3, codificado en SPI-2. Entre éstas se encuentran SseB, SseC, SseD, SseF, SseG, SseI, SseJ, PipB, SopD2, SifA, SifB, SspH2 y SpiC. El papel de estas proteínas no ha sido caracterizado con tanto detalle y sólo se ha sugerido una probable función para algunas de ellas. Entre éstas se encuentran: inhibición de la fusión entre los lisosomas y las SCV's, modificación de los lípidos de membrana de las SCVs para facilitar la replicación y división celular, inducción de la muerte celular tipo apoptosis, control de la dinámica de las SCVs y mantenimiento de la estabilidad de sus membranas, localización de las SCVs en la cercanía del Aparato de Golgi, interferencia con la localización de sintasas de óxido nítrico (iNOS) en las SCVs y formación de Sifs (Uchiya *et al.*, 1999; Vázquez-Torres *et al.*, 2000; Beuzón *et al.*, 2000; Catron *et al.*, 2002; Chakravorty *et al.*, 2002; Waterman y Holden, 2003; Kuhle y Hensel, 2004).

SpiC es necesaria tanto para la secreción *in vitro* de SseB, SseC y SseD, como para la translocación de proteínas efectoras dependientes del SST3 de la SPI-2 de la bacteria contenida en la vacuola, hacia el citosol de los macrófagos infectados (Freeman *et al.*, 2002). La proteína SseJ es 30% idéntica a una acetiltransferasa de *Aeromonas*; debido a esto se ha sugerido que su función es modificar los lípidos de membrana de las SCVs para facilitar la replicación y división celular (Waterman y Holden, 2003). SseG localiza las SCVs en la cercanía del aparato de Golgi de la célula hospedadora; se ha demostrado que es necesario un Golgi intacto y funcional para que la replicación intracelular de *Salmonella* se lleve a cabo (Salcedo y Holden, 2003). Se ha sugerido que el contacto cercano entre las membranas del SCVs y el Golgi podría facilitar eventos de fusión transitorios entre estos dos compartimentos, lo que resultaría en la adquisición de

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

Los Sifs (*Salmonella*-induced filaments) son estructuras filamentosas y tubulares que aparecen cuando la bacteria inicia su replicación. Se originan a partir de las SCVs y se extienden desde la membrana de estos compartimentos a través de la célula entera sobre un sostén de microtúbulos, eventualmente conectando SCVs separadas (Waterman y Holden, 2003; Guiney y Lesnick, 2005). La función de los Sifs no se ha elucidado, pero su formación es dependiente de las efectoras SifA, SseF, SseG, PipB2 y SopD2 (Waterman y Holden, 2003; Guiney y Lesnick, 2005; Haraga *et al.*, 2008). SifA es la principal proteína efectora necesaria para la inducción de estas estructuras, es requerida para mantener la integridad membranal de las SCVs y es esencial para la sobrevivencia intramacrófago (Beuzon *et al.*, 2000). El papel de las otras efectoras aún no es del todo claro. SopD2 y PipB2 cooperan con SifA para inducir la formación de los Sifs por un mecanismo no definido (Haraga *et al.*, 2008). Se ha reportado que las efectoras SseF y SseG son responsables de inducir el reclutamiento masivo de microtúbulos en estadios tardíos de la infección y que promueven la agregación de vesículas endosomales y reclutan vesículas derivadas del Golgi hacia las SCV (Kuhle y Hensel, 2004).

S. enterica ha desarrollado diferentes mecanismos para evadir el daño causado por componentes antimicrobianos tales como las especies reactivas tóxicas de oxígeno (ROI) o los intermediarios de nitrógeno (RNI). Las proteínas secretadas de SPI-2 interfieren con el tráfico de oxidasas NADPH hacia las SCVs y evitan, por tanto, la exposición hacia estos metabolitos (Vázquez-Torres y Fang, 2001). Se ha propuesto que SseB es necesaria para prevenir la localización de NADPH oxidasa, así como la formación de radicales reactivos de oxígeno en la membrana del fagosoma de macrófagos murinos. Sin embargo, no se sabe si este efecto es debido a la actividad directa de SseB dentro del macrófago o si esta proteína se requiere para translocar otras proteínas al interior de los macrófagos (Vázquez-Torres *et al.*, 2000). Por otro lado, SpiC interfiere con el tráfico celular al inhibir la fusión de los fagosomas que contienen a *Salmonella* con los lisosomas, evitando así la exposición a las enzimas lisosomales (Uchiya *et al.*, 1999). Se han reportado dos

proteínas blanco para SpiC, llamadas TassC y Hook3. Se propone que la primera podría ser requerida para la fusión de distintos compartimentos endosomales con el fagosoma, mientras que la segunda es miembro de una familia de proteínas involucrada en tráfico celular y podría unir organelos específicos a los microtúbulos (Kuhle y Hensel, 2004).

Aunado a lo anterior, *Salmonella* expresa enzimas que inactivan directamente radicales tóxicos de oxígeno y nitrógeno, como la catalasa y superoxidodismutasas (SODs) como Fe-SOD (*sodB*), Mn-SOD (*sodA*), Cu/Zn-SOD (*sodC*) (Vázquez-Torres y Fang, 2001; Prost *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010). Se ha demostrado que la presencia de especies reactivas de oxígeno liberadas como resultado de la inflamación inducida por *Salmonella*, pueden ser también benéficas para la bacteria, ya que reaccionan con el tiosulfato luminal para producir tetrionato y este compuesto puede ser usado como aceptor terminal de electrones para la respiración, permitiendo la producción de energía más eficiente (Winter *et al.*, 2010).

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

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

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

Después de que las bacterias se replican en los macrófagos, se liberan hacia el torrente sanguíneo, lo cual causa septicemia y la invasión generalizada en el organismo, colonizando órganos como el hígado y el bazo, entre otros (Jones y Falkow, 1996; Hansen-Wester y Hensel, 2001).

La septicemia o bacteremia puede ocurrir después de la infección entérica manifiesta o en ausencia de signos de enfermedad intestinal. Alternativamente, se ha reportado que *Salmonella* puede llegar al hígado y al bazo por una ruta alterna que no requiere colonización intestinal o invasión de las células epiteliales intestinales. En esta vía, la bacteria es transportada directamente desde el lumen del intestino a la circulación sanguínea, bazo e hígado mediante fagocitos que expresan CD18 (Vázquez-Torres *et al.*, 1999).

Las células fagocíticas de los nódulos linfáticos intestinales, hígado o vejiga pueden alojar al microorganismo en forma persistente, incluso en ausencia de su liberación, por lo que los hospedadores pueden permanecer como portadores sanos.

1.4. Modelos animales empleados para el estudio de la salmonelosis

Para llevar a cabo el estudio de las patologías humanas causadas por *Salmonella*, los modelos animales han sido una herramienta invaluable (Santos *et al.*, 2001).

Los ratones infectados con *S. Typhimurium* desarrollan una infección sistémica caracterizada por multiplicación bacteriana en el hígado y bazo e infiltrado de células mononucleares (Modelo de tifoidea murina) (Tsolis *et al.*, 1999), la cual es similar a la enfermedad sistémica que causa *S. Typhi* en humanos. Así, las infecciones a ratones con *S. Typhimurium* se emplean como modelo para el estudio de la enfermedad sistémica (fiebre tifoidea) producida por *Salmonella*.

Por otro lado, *S. Typhimurium* provoca en los becerros una enfermedad que se restringe a la mucosa intestinal y linfonodos regionales caracterizada por infiltrado de neutrófilos, que semeja la enfermedad que este serotipo causa en el humano, por lo que las infecciones en estos animales se emplean como modelos para el estudio de la enfermedad intestinal (Modelo de gastroenteritis en becerros) (Tsolis *et al.*, 1999). Adicionalmente, se ha desarrollado en estos animales un modelo de asas del íleon

ligadas, el cual permite estudiar mejor el desarrollo de la inflamación intestinal durante tiempos tempranos después de la infección (Tsolis *et al.*, 2011).

Una de las principales limitaciones para el uso de los becerros como modelo para la gastroenteritis es la necesidad de contar con instalaciones especiales para su mantenimiento, así como personal altamente capacitado en el manejo de estos animales. Por tal motivo, se desarrolló un modelo murino para el estudio de la enteropatogénesis, que consiste en emplear ratones precondicionados con tratamientos con estreptomycin, lo cual los hace susceptibles a la infección oral por *S. Typhimurium* o *S. Enteritidis* (Modelo de colitis murina) (Tsolis *et al.*, 2011). 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, lo que le provoca una enteritis caracterizada por infiltrado de neutrófilos principalmente en el ciego (Barthel *et al.*, 2003). Por tanto, este modelo se ha empleado para estudiar las consecuencias del reclutamiento intestinal de neutrófilos durante la gastroenteritis inducida por *S. Typhimurium* (Tsolis *et al.*, 2011).

Recientemente, la ligación de asas ileales de macacos Rhesus infectados con el virus de inmunodeficiencia en simios (VIS), ha sido usada como modelo para estudiar la bacteremia producida por las salmonelosis no tifoideas en individuos infectados con el virus de VIH (Raffatellu *et al.*, 2008a).

1.5. Regulación genética de las SPIs

Las bacterias patógenas requieren regular sus factores de virulencia para expresarlos en el tiempo y nicho adecuado durante el curso de una infección, lo cual es un determinante básico de la patogenicidad. Para ello, estos microorganismos han desarrollado mecanismos moleculares que regulan la expresión genética en respuesta a señales fisicoquímicas que son detectadas del entorno a través de diversas proteínas reguladoras.

1.5.1. Señales físico-químicas que influyen en la expresión de SPI-1 y SPI-2

Se ha reportado que los genes de SPI-1 y SPI-2 se expresan *in vivo* e *in vitro* en respuesta a diferentes condiciones ambientales (Hansen-Wester and Hensel, 2001). En el

lumen intestinal se expresan tanto los genes de SPI-1 como los genes de SPI-2 (Brown *et al.*, 2005); mientras que, cuando *Salmonella* se encuentra dentro de las células sólo se expresan los genes de SPI-2 (Lee *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2003; Eriksson *et al.*, 2003; Cirillo *et al.*, 1998). *In vitro*, en condiciones de laboratorio se han empleado diferentes medios de cultivo para estudiar la expresión de estos genes. La expresión de los genes de SPI-1 se induce cuando *Salmonella* crece en el medio de cultivo rico en nutrientes LB (Luria-Bertani), mientras que la expresión de los genes de SPI-2 se induce en medios mínimos con bajas concentraciones de magnesio, fosfato y calcio (Deiwick *et al.*, 1999).

El nivel de oxígeno, la osmolaridad y el pH son condiciones ambientales que afectan la expresión de los genes involucrados en el proceso de invasión (Hansen-Wester y Hensel, 2001). La expresión de los genes de SPI-1 se induce en condiciones de baja concentración de oxígeno, alta osmolaridad (altas concentraciones de NaCl y sucrosa) y pH neutro, condiciones que se encuentran en el intestino (Bajaj *et al.*, 1996; Altier, 2005; Mizusaki *et al.*, 2008).

Como consecuencia de su actividad metabólica, los microorganismos presentes en el intestino producen ácido grasos de cadena corta. La concentración de éstos varía a través del tracto gastrointestinal. Se ha reportado que el acetato y el formato, presentes en bajas concentraciones en el intestino delgado (30 mM), favorecen la expresión de los genes de SPI-1 y por lo tanto la invasión, mientras que el propionato y el butirato, presentes en grandes cantidades (200 mM) en el ciego y en el colon, tienen el efecto opuesto (Durant *et al.*, 2000; Lawhon *et al.*, 2002; Gantois *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008). Además, se conoce que otros factores como la bilis, secretada en la porción proximal del intestino delgado, y péptidos catiónicos existentes dentro de los macrófagos, también ejercen un efecto negativo sobre la expresión de estos genes (Behlau y Miller, 1993; Fahlen *et al.*, 2000; Prouty y Gunn, 2000; Lawhon *et al.*, 2002; Bader *et al.*, 2003; Boyen *et al.*, 2008).

Por otro lado, para el caso de la SPI-2, se ha reportado que concentraciones limitantes de cationes divalentes (calcio y magnesio) y fosfato, favorecen la expresión de los genes de esta isla (García Vescovi *et al.*, 1996; Deiwick *et al.*, 1999; Lober *et al.*, 2006). Así mismo, el pH ácido es otra condición que favorece la expresión de los genes de SPI-2, ya que la inhibición de la acidificación del fagosoma reduce la replicación intracelular de *S. Typhimurium* (Deiwick *et al.*, 1999; Lober *et al.*, 2006).

La expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 está controlada, además, por la fase de crecimiento bacteriano, la motilidad y la utilización de carbohidratos (Lee y Falkow, 1990; Jones *et al.*, 1992., Schiemann, 1995). Así mismo, se ha propuesto que el ppGpp (tetrafosfato de guanósina), 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 y SPI-2 en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno (Pizarro-Cerda y Tedin, 2004; Song *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2006).

1.5.2. Reguladores positivos y negativos que controlan la expresión de SPI-1 y SPI-2

Los reguladores que tienen efecto positivo y negativo sobre la expresión de los genes de ambas islas se señalan en las figuras 5 y 6.

1.5.2.1. SPI-1

En el caso de SPI-1, HilA, un miembro de la familia de reguladores transcripcionales de OmpR/ToxR, activa los operones *prg/org* (phosphate-repressed genes/oxygen-regulated genes) e *inv/spa* (Bajaj *et al.*, 1995; Lostroh y Lee, 2001a; Jones, 2005), al unirse directamente a sus regiones promotoras, en sitios denominados “cajas HilA” (HilA boxes). HilA puede inducir también la expresión de los genes *siiA* y *siiE* localizados en la SPI-4, a través de inducir la expresión de SprB localizado en la SPI-1, eliminando la represión que el regulador global H-NS ejerce sobre estos genes (Thijs *et al.*, 2007; Main-Hester *et al.*, 2008; Saini y Rao, 2010). Por otro lado, HilA puede unirse directamente a su propia región reguladora y actuar como un regulador negativo de su propia expresión (De Keersmaecker *et al.*, 2005). Así mismo, se ha reportado que puede actuar como represor de SPI-2 y del flagelo, al unirse directamente a las regiones reguladoras de los genes *ssaH* (SPI-2) y *flhD* (flagelar), respectivamente (Thijs *et al.*, 2007).

HilA también activa la expresión de un segundo activador transcripcional, InvF, un miembro de la familia de reguladores transcripcionales AraC, que a su vez induce la expresión de los operones *sip/sic* e *inv/spa* (Darwin y Miller, 1999; Lostroh *et al.*, 2000). Además, InvF y la chaperona SicA controlan la expresión de SopB/SigD y de SopE, que están codificadas fuera de SPI-1 (Eichelberg y Galán, 1999).

La expresión de HilA está controlada por un complejo circuito de regulación que involucra algunos reguladores adicionales codificados en SPI-1, como HilD y HilC. Estos dos reguladores pertenecen a la familia AraC/XylS, y controlan positivamente su propia expresión y la de HilA al contrarrestar la represión que ejercen H-NS y Hha sobre su promotor (Schechter *et al.*, 1999; Lucas y Lee 2001; Schechter y Lee 2001; Olekhnovich y Kadner, 2002; Boddicker *et al.*, 2003; Olekhnovich y Kadner, 2004; Ellermeier *et al.*, 2005, Ellermeier y Slauch, 2007). Adicionalmente, HilD y HilC pueden inducir la expresión de InvF por una vía independiente de HilA, puesto que se unen a un promotor de *invF* que se encuentra corriente arriba del promotor dependiente de HilA (Akbar *et al.*, 2003). Por otro lado, HilD controla directamente la expresión de InvR, un ARN pequeño codificado en SPI-1. InvR no está directamente involucrado en la regulación de SPI-1, pero actúa como represor post-transcripcional del ARNm de *ompD*. Aunque no se conoce el impacto biológico real que esto puede tener, se ha especulado que la represión de la porina más abundante en *Salmonella* (OmpD) por parte de InvR, podría haber contribuido al establecimiento exitoso del SST3 en la membrana, después de la adquisición de SPI-1 (Pfeiffer *et al.*, 2007). Recientemente se ha reportado que la expresión de HilD es controlada negativamente por SprB, codificado en SPI-1, el cual es regulado positivamente por HilA (Saini y Rao, 2010).

La expresión de SPI-1 también se controla por reguladores que se encuentran codificados fuera de las SPIs, aunque el mecanismo de acción de varios de ellos aún no es del todo claro. Entre éstos se encuentran BarA/SirA, CsrB/C, RtsA, FliZ, FadD, Hu, Fis, IHF, TolC, Mlc, Fur, CpxA y Hfq, que controlan positivamente su expresión, y H-NS, Hha, Lon, HilE, CsrA, PhoP/PhoQ, PhoR/PhoB, ClpX, Lrp y TviA, que la regulan negativamente (Altier *et al.*, 2000a; Altier *et al.*, 2000b; Lucas *et al.*, 2000; Fahlen *et al.*, 2001; Iyoda *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001; Baxter *et al.*, 2003; Ellermeier y Slauch, 2003; Nakayama *et al.*, 2003; Schechter *et al.*, 2003; Takaya *et al.*, 2003; Fortune *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006; Sittka *et al.*, 2008; Bayoumi y Griffiths, 2010; Troxell *et al.*, 2011).

Algunos de estos reguladores actúan regulando la expresión del regulador central, HilA. TolC, Fis y Fur, lo regulan positivamente, éste último indirectamente, actuando como desrepresor, ya que reprime a H-NS y así elimina la represión que éste ejerce sobre *hilA* (Wilson *et al.*, 2001; Virlogeux *et al.*, 2008; Troxell *et al.*, 2011). H-NS es una proteína tipo histona que se une al DNA en regiones ricas en A-T y es capaz de multimerizar para

formar complejos sobre los promotores de los genes que regula, impidiendo de esta manera su expresión (Dorman y Deighan, 2003). Se ha demostrado que H-NS es el encargado de silenciar selectivamente genes adquiridos por transferencia horizontal, lo cual provee a la bacteria de un mecanismo que la protege de los efectos detrimentales que puede ocasionar la expresión no controlada de genes de nueva adquisición (Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006). Hha es miembro de la familia de proteínas tipo histona asociadas a nucleóide que incluye a H-NS, HU y YmoA (Fahlen *et al.*, 2001). Además de reducir significativamente la expresión de *hilA*, se ha reportado que la sobre expresión de Hha reduce la transcripción de genes necesarios para la invasión que son regulados por HilA, como *invF*, *prgH* y *sipC* (Fahlen *et al.*, 2001). La acción cooperativa de H-NS y Hha es la responsable del silenciamiento de *hilA* bajo condiciones de baja osmolaridad (Olekhnovick y Kadner, 2006). Estos dos reguladores pueden unirse individualmente a múltiples sitios ricos en A-T en las secuencias que flanquean *hilA*. Lrp regula negativamente a *hilA* uniéndose a su región reguladora, así como a la de *invF* (Baek *et al.*, 2009). El sistema de dos componentes PhoR/PhoB puede también regular negativamente la expresión de *hilA*, en respuesta a bajas concentraciones de fosfato (Lucas y Lee, 2001).

Otros reguladores actúan controlando la expresión de HilD y por lo tanto, regulan de esta manera la expresión de HilA indirectamente. Entre éstos están FliZ, HilE y Lon, que regulan directamente la expresión o actividad de HilD; así como ClpXP, Sigma 32, DnaK o Mlc, que regulan a HilD de manera indirecta. FliZ, proteína reguladora de los genes flagelares, regula postraduccionalmente a HilD, controlando la actividad de esta proteína, más que su estabilidad. Esto lo lleva a cabo de manera independiente a HilE y Lon, las cuales también controlan postraduccionalmente a HilD; la primera uniéndose a HilD y favoreciendo que ésta sea degradada por proteasas, y la segunda, degradando a HilD y HilC directamente (Baxter *et al.*, 2003; Takaya *et al.*, 2005; Chubiz *et al.*, 2010). Mlc modula positivamente la concentración de HilD al unirse directamente a la región reguladora de *hilE* y reprimir su expresión (Lim *et al.*, 2007). La proteína sigma 32 (σ^{32}) induce la expresión de la proteasa Lon, con lo que se establece una vía más de regulación postraduccional de la expresión de HilD (Matsui *et al.*, 2008). Para contrarrestar dicha degradación, se ha propuesto a la proteína DnaK, la cual inhibe la función de σ^{32} , con lo que modula la expresión de Lon y por lo tanto la concentración de

HilD (Matsui *et al.*, 2008). ClpXP por su parte, es una proteasa que degrada a los reguladores centrales del flagelo, FlhD/C, con lo que indirectamente reprime la expresión de FlhZ y por lo tanto reprime la expresión de HilD a nivel postraduccional (Kage *et al.*, 2008).

Así mismo, se ha reportado que la metilación Dam (por deoxiadenosil metiltransferasas) ejerce regulación postranscripcional sobre la expresión de *hilD*, ya que la estabilidad de su ARNm se ve afectada en ausencia de la metilación Dam (López-Garrido y Casadesús, 2010).

En años recientes el descubrimiento de gran cantidad de ARNs pequeños ha puesto de manifiesto que estos elementos tienen un papel importante en el control de la expresión genética en bacterias. Hfq es una chaperona de ARN que interactúa con ARN pequeños y ARNm; aunque puede actuar sola como represor traduccional de ARNm, actúa principalmente en conjunto con los ARN pequeños y tal vez la evidencia más fuerte de que estos tienen funciones importantes en *Salmonella*, proviene del trabajo hecho con Hfq. Hfq controla, directa o indirectamente, la expresión de casi una quinta parte de todos los genes de *Salmonella*, incluyendo genes de SPI-1, SPI-2, SPI-4 y SPI-5. Para SPI-1, Hfq controla la expresión del ARN pequeño InvR codificado en esta isla (Vogel, 2009). Así mismo, se ha reportado que Hfq afecta la secreción de proteínas de SPI-1 y dicho efecto podría ser atribuido a que regula la expresión de HilD, al unirse directamente a su ARNm (Sittka *et al.*, 2008).

SgrS es un ARN pequeño que regula la producción de SopD, una proteína que no es codificada dentro de SPI-1, pero que es secretada por el SST3 codificado en esta isla y que contribuye a la invasión de las células intestinales (Vogel, 2009; Papenfort y Vogel, 2010).

IsrJ es otro ARN pequeño que está involucrado en la invasión, cuya expresión es controlada por HilA. Mutaciones en este ARN pequeño afectan el proceso de translocación de proteínas efectoras a la célula hospedadora, lo que confirmó que forma parte del regulón SPI-1 (Padalon-Brauch *et al.*, 2008; Papenfort y Vogel, 2010).

Señales físico-químicas:

Fase de crecimiento
Oxígeno
Osmolaridad
pH
Acetato, formato
Propionato, butirato
Bilis
Péptidos catiónicos
ppGpp

Reguladores con efecto positivo:

SirA/BarA	Fis
CsrB, CsrC	IHF
RtsA	TolC
FliZ	Mlc
FadD	Fur
Hu	CpxA

Reguladores con efecto negativo:

H-NS	PhoP/PhoQ
Hha	PhoR/PhoB
Lon	ClpXP
HilE	Lrp
CsrA	TviA
FliZ	σ 32

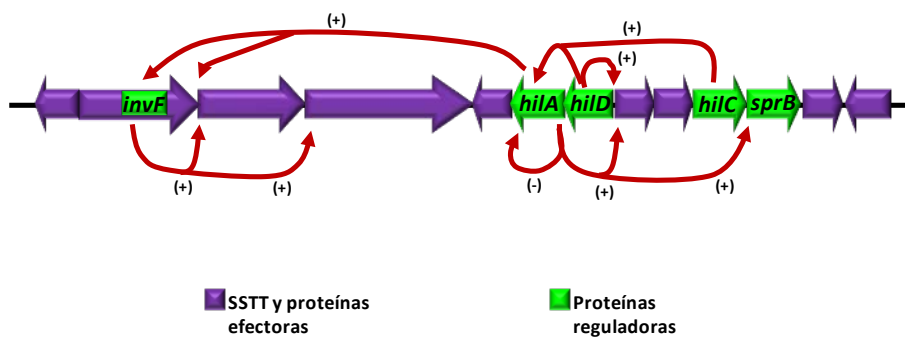


Figura 5. Regulación de la expresión génica de SPI-1. El esquema muestra las redes de control genético que se establecen entre los reguladores codificados en la SPI-1, HilD, HilC, HilA, InvF y SprB. Arriba se enlistan las condiciones físico-químicas que están involucradas en la expresión de estos genes, así como los reguladores codificados fuera de la SPI-1 que tienen efecto negativo o positivo sobre la expresión de esta isla (ver el texto para los detalles de cada uno).

1.5.2.2. SPI-2

En SPI-2 se encuentra el operón *ssrAB* que codifica el sistema de dos componentes SsrA/SsrB, el cual regula la expresión de todos los genes de esta isla en respuesta a bajas concentraciones de calcio y fósforo, pH bajo y baja osmolaridad (Valdivia y Falkow, 1997; Deiwick *et al.*, 1999; Hensel, 2000; Miao *et al.*, 2002; Garmendia *et al.*, 2003; Lober *et al.*, 2006; Walthers *et al.*, 2007; Xu y Hensel, 2010). SsrA es la cinasa detectora de señales ambientales que fosforila a SsrB, la proteína reguladora que actúa como desrepressor, ya que induce la transcripción de los operones *sse*, *ssc* y *ssa* de SPI-2, al eliminar la represión que H-NS ejerce sobre la región reguladora de estos operones (Walthers *et al.*, 2007; Walthers *et al.*, 2011). Así mismo, SsrB es capaz de autoregular positivamente su propia expresión al unirse a la región reguladora del operón *ssrAB* (Feng *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2004) y también es capaz de regular varios genes

localizados fuera de las islas, pero para los cuales no se ha descrito exactamente su función en la patogénesis de *Salmonella* (Worley *et al.*, 2000).

La expresión de SsrA/B es a su vez controlada por reguladores codificados fuera de las SPIs. Entre los reguladores positivos se encuentran los sistemas de dos componentes EnvZ/OmpR y PhoP/PhoQ, así como los reguladores SlyA, Fis e IHF (Lee *et al.*, 2000; Bijlsma y Groisman, 2005; Linehan *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006). EnvZ/OmpR y PhoP/PhoQ controlan positivamente la expresión del operón *ssrAB* y de los genes controlados por éste (Worley *et al.*, 2000; Xu y Hensel, 2010). EnvZ y PhoQ son las cinasas detectoras de señales ambientales que fosforilan a OmpR y PhoP, las proteínas reguladoras de respuesta, respectivamente.

El sistema de dos componentes PhoP/PhoQ controla más de 40 genes de virulencia, algunos de los cuales están involucrados en la supervivencia intramacrófago (Bijlsma y Groisman, 2005). PhoQ es reprimido en presencia de concentraciones altas de cationes divalentes (Mg^{2+} , Ca^{2+} o Mn^{2+}) y se ha reportado que esto es debido a que dichos cationes se unen a PhoQ y forman puentes entre la superficie de la proteína y la membrana interna (Prost *et al.*, 2007; Prost y Miller, 2008). Se han reconocido dos señales que lo activan aún en presencia de cationes divalentes; éstas son la presencia de concentraciones subinhibitorias de péptidos antimicrobianos y el pH ácido, que actúan de manera independiente y aditiva y que son reconocidos directamente por PhoQ (Prost *et al.*, 2007; Prost y Miller, 2008). La presencia de péptidos antimicrobianos y la exposición a pH bajo, desestabilizan los puentes formados por los cationes divalentes y de esta manera PhoQ puede ser activado para posteriormente activar a PhoP (García Vescovi *et al.*, 1996; Prost *et al.*, 2007; Prost y Miller, 2008). PhoP induce la expresión del sistema SsrA/B al unirse directamente a la región reguladora de *ssrB*, y se ha reportado que también funciona como represor de los genes de SPI-1, específicamente de los genes *prgs* (PhoP-repressed genes) (Bijlsma y Groisman, 2005). Existe controversia en cuanto al papel regulador de este sistema de dos componentes, puesto que también se ha reportado que pese a que este sistema es inducido intracelularmente, no es requerido para la activación del operón *ssrAB* (Miao *et al.*, 2002; Kim y Falkow, 2004).

OmpR fosforilado se une directamente a la región reguladora del operón *ssrAB* y se ha reportado que el sistema EnvZ/OmpR induce la expresión de los genes de SPI-2 en respuesta a pH ácido y aunque en menor grado que SsrAB, también lo hace en respuesta

a baja osmolaridad y bajas concentraciones de calcio (Lee *et al.*, 2000; Garmendia *et al.*, 2003; Kim y Falkow, 2004). En *E. coli*, se ha reportado que la actividad de EnvZ/OmpR es modulada por la proteína de membrana MzrA, que interactúa directamente con EnvZ, con lo que modula la actividad enzimática de ésta para favorecer la acumulación de OmpR-P, presumiblemente favoreciendo su actividad de autocinasa o disminuyendo su actividad de fosfatasa (Gerken y Misra, 2010). Esto facilita la interacción de OmpR con el DNA y lo capacita para unirse a promotores que normalmente no reconoce (Gerken *et al.*, 2009).

El regulador transcripcional SlyA, de la familia de reguladores MarR/SlyA, también actúa como regulador positivo de la expresión del sistema SsrA/B (Libby *et al.*, 1994). Se ha reportado que exhibe redundancia funcional con OmpR-EnvZ, ya que la presencia de uno de ellos es capaz de compensar parcialmente la ausencia del otro (Linehan *et al.*, 2005). Se ha reportado además que la expresión de SlyA es regulada positivamente por PhoP, el cual se une directamente a la región reguladora del gen *slyA*. A su vez, SlyA se une a la región reguladora de *phoPQ* y antagoniza de esta manera al regulador negativo H-NS, con lo que permite que PhoP pueda unirse a su propio promotor, activando subsecuentemente al operón *phoPQ*. Este mismo mecanismo en el que SlyA actúa como desrepressor de H-NS para posteriormente facilitar la activación mediada por PhoP, ha sido reportado para otros genes adquiridos por transferencia horizontal, como los *pag* localizados en SPI-2 (Pérez *et al.*, 2008). Así mismo, se ha reportado que SlyA puede regular positivamente la transcripción de *ompR/envZ* que responde a estrés osmótico y de *cpxRA*, que responde a condiciones de estrés extracelular (Song *et al.*, 2008).

Dentro de los reguladores que tienen efecto negativo sobre los genes de SPI-2 se encuentran, además del ya mencionado H-NS, YdgT, Hha y EIIA^{Ntr} (Fass y Groisman, 2009, Bayoumi and Griffiths, 2010; Choi *et al.*, 2010).

YdgT tiene la actividad de regulador negativo para la expresión de los genes de SPI-2. Se ha reportado que aunque la remoción de *ydgT* aumenta los niveles de transcripción de los genes de SPI-2, una cepa con dicha mutación está atenuada en virulencia en el modelo murino, lo que sugiere que el mantenimiento de los niveles de expresión adecuados de SPI-2 es otro factor determinante para la patogénesis de *Salmonella* (Coombes *et al.*, 2005b). Esta proteína comparte una identidad de 39% y 35% con YmoA y Hha, respectivamente, las cuales modulan negativamente la expresión de genes de virulencia en *Yersinia* y *E. coli* (Madrid *et al.*, 2002). Hha actúa como represor de

la expresión de los genes de SPI-2 antes de que la bacteria detecte los factores ambientales que inducen su expresión, como bajas concentraciones de magnesio, de fosfato y el pH ácido (Silphaduang *et al.*, 2007). Tanto Hha como YdgT son capaces de interactuar con H-NS, y se ha demostrado que ambas forman complejos con H-NS para silenciar a los genes que regulan. Muchos de los genes cuya expresión es regulada por H-NS localizados en DNA adquirido por transferencia horizontal, son genes para los cuales H-NS requiere la formación de complejos heteroméricos con proteínas del tipo Hha para llevar a cabo una eficiente represión de su expresión (Vivero *et al.*, 2008).

EIIA^{Ntr} es una enzima codificada en el gen *ptsN*, que forma parte del sistema metabólico fosfotransferasa (PTS) y que fue identificada en *E. coli* como supresor de algunos fenotipos letales (Powell *et al.*, 1995). En *Salmonella* se ha reportado que esta enzima evita la hiperactivación de los genes de SPI-2 y actúa a nivel postranscripcional al interactuar directamente con la proteína reguladora SsrB y evitar que ésta reconozca a sus promotores blanco (Choi *et al.*, 2010).

Señales físico-químicas:

Fase de crecimiento
pH
Ca
Mg
Fosfatos
ppGpp
Osmolaridad
Péptidos antimicrobianos

Reguladores con efecto positivo:

EnvZ/OmpR
PhoP/PhoQ
SlyA
Fis/IHF

Reguladores con efecto negativo:

H-NS
YdgT
Hha
EIIA^{Ntr}

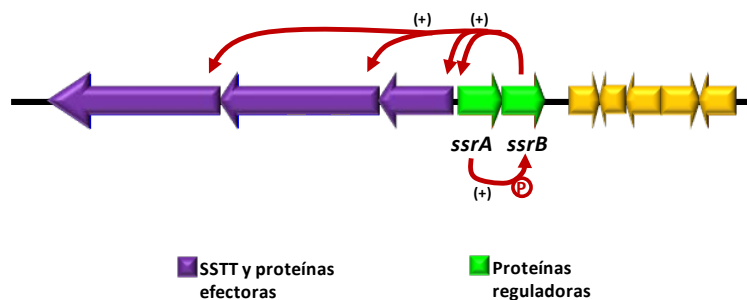


Figura 6. Regulación de la expresión génica de SPI-2. El esquema muestra el control genético que ejerce el regulador central de SPI-2, el sistema de dos componentes SsrA/SsrB, sobre los genes de esta isla. Las condiciones físicoquímicas que están involucradas en la expresión de estos genes, así como los reguladores codificados fuera de la SPI-2, que tienen efecto negativo o positivo sobre la expresión de esta isla, se enlistan arriba (ver el texto para los detalles de cada uno).

2. ANTECEDENTES

En un estudio previo demostramos que cuando *Salmonella* crece en LB, HilD, el regulador codificado en SPI-1, induce la expresión consecutiva de los genes de SPI-1 y SPI-2, en la fase estacionaria temprana y tardía de crecimiento, respectivamente (Bustamante *et al.*, 2008), lo que reveló una comunicación entre las principales islas de patogenicidad de *Salmonella*. HilD regula directamente a *hilA* y, junto con OmpR, al operón *ssrAB*, los genes que codifican a HilA y al sistema de dos componentes SsrA/B, los reguladores positivos centrales de los genes de SPI-1 y SPI-2, respectivamente (Schechter *et al.*, 1999; Lucas y Lee, 2000; Schechter y Lee, 2001; Bustamante *et al.*, 2008).

De manera interesante, HilD se requiere para la expresión del operón *ssrAB*, y por lo tanto de los genes de SPI-2, cuando *Salmonella* crece en el medio LB, pero no se requiere cuando esta bacteria crece en medio mínimo (Bustamante *et al.*, 2008), que son las condiciones de crecimiento en las cuales se había estudiado previamente la expresión de los genes de SPI-2. Cuando *Salmonella* crece en medio mínimo, la expresión de *ssrAB* depende de los reguladores OmpR, PhoP y SlyA (Lee *et al.*, 2000; Bijlsma y Groisman, 2005., Linehan *et al.*, 2005).

Para inducir la expresión de los genes de SPI-1, HilD se une a la región reguladora de *hilA*, lo cual contrarresta la represión que ejerce el regulador global H-NS sobre el promotor de este gen (Schechter y Lee, 2001). En ausencia de H-NS ya no se requiere de HilD para la expresión de *hilA*, lo cual indica que HilD, más que actuar como un activador clásico, parece funcionar principalmente como un anti-represor (Olekhovich y Kadner, 2006). En nuestro estudio previo determinamos que tanto HilD como H-NS interactúan con la región reguladora de *ssrAB*. Así mismo, demostramos que en ausencia de H-NS ya no se requiere a HilD para la expresión de este operón, lo cual sugiere que HilD induce la expresión de *ssrAB* y de esta forma de los genes de SPI-2 (Bustamante *et al.*, 2008), contrarrestando la represión que ejerce H-NS sobre el promotor de *ssrAB*. Sin embargo, quedó por definir con precisión cuáles son las secuencias de *ssrAB* necesarias para su regulación mediada por HilD y H-NS.

Por otro lado, durante mi proyecto de maestría encontramos que SirA, un regulador global codificado fuera de las SPIs, también controla la expresión de los genes de SPI-2.

SirA (“*Salmonella* invasion regulator”) es el regulador de respuesta del sistema de dos componentes BarA/SirA, en el que BarA (“Bacterial adaptive response”) es la cinasa detectora de señales ambientales (Johnston *et al.*, 1996, Altier *et al.*, 2000a, Teplitski *et al.*, 2003).

Existen ortólogos del sistema BarA/SirA en diferentes bacterias que incluyen patógenos de plantas y animales, así como especies de vida libre, comensales y simbioses, incluyendo a *E. coli* (BarA/UvrY), *Pseudomonas* (GacS/GacA), *Erwinia carotovora* (ExpS/ExpA), *Legionella pneumophila* (LetS/LetA) y *Vibrio cholerae* (VarS/VarA) (Goodier y Ahmer, 2001; Lapouge *et al.*, 2008). Estos sistemas controlan la expresión de genes asociados con virulencia, metabolismo secundario, motilidad, producción de exoenzimas, “quórum sensing” o formación de biopelículas (Goodier and Ahmer, 2001; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008).

En *E. coli*, el sistema BarA/UvrY regula la expresión de dos ARNs no traducidos, CsrB y CsrC, cada uno de los cuales contiene varios motivos reconocidos por la proteína de unión a ARN, CsrA (Babitzke and Romeo, 2007; Suzuki *et al.*, 2002; Liu 1997, Weilbacher 2003). CsrA es una proteína homodimérica que se une a secuencias que se superponen a la secuencia Shine-Dalgarno de ARNs específicos, con lo que bloquea la unión a ribosomas y la traducción, promoviendo su degradación (Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008; Romeo, 1998). CsrB y CsrC neutralizan la función de CsrA al unirse a ella y secuestrarla, con lo que contrarrestan el efecto postranscripcional negativo que tiene esta proteína (Babitzke and Romeo, 2007; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008; Romeo, 1998). El sistema Csr ha sido involucrado en la expresión de los genes de SPI-1 (Altier *et al.*, 2000a; Altier *et al.*, 2000b; Fortune *et al.*, 2006), pero no se han definido sus genes blanco directos.

En el caso de *Salmonella*, el sistema BarA/SirA controla positivamente la expresión de los genes de SPI-1 y por tanto controla la capacidad de *Salmonella* para invadir células eucarióticas y provocar la enfermedad intestinal (Johnston *et al.*, 1996; Ahmer *et al.*, 1999; Altier *et al.*, 2000a; Teplitski *et al.*, 2003). Su papel en la expresión de estos genes comenzó a ser estudiado cuando se encontró que en mutantes *sirA* se disminuye la expresión de *hilA*. Sin embargo hasta hace poco no era claro si SirA controlaba la expresión de *hilA* de manera indirecta o si lo hacía directamente al unirse a la región reguladora de *hilA*. Como ya se mencionó, en mi proyecto de maestría demostramos que

SirA controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, actuando a través de controlar positivamente la expresión de Hild, codificado en SPI-1. Sin embargo, el mecanismo por medio del cual lleva a cabo dicha regulación, no fue elucidado.

Así, aunque ambos reguladores, SirA y Hild, son necesarios para la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, desconocíamos cómo se coordinan estos reguladores para llevar a cabo su función.

Con base en estos antecedentes, en mi proyecto de doctorado trabajamos para contestarnos la siguiente pregunta: ¿cómo controlan SirA y Hild la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2?

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

SirA induce la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 en cascada a través de los ARNs CsrB y CsrC que controlan positivamente la expresión del regulador HilD, el cual induce la expresión de los genes de SPI-2, contrarrestando la represión que ejerce H-NS en *ssrAB*.

3.2. OBJETIVO GENERAL

Definir los mecanismos que regulan la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 de *Salmonella*.

3.3. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar de qué manera el sistema BarA/SirA regula positivamente a los genes de SPI-1 y SPI-2.
- 2.- Definir las secuencias en *cis* necesarias para la regulación de *ssrAB* mediada por HilD y H-NS.

3.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Definir si BarA/SirA y HilD actúan en cascada para regular a los genes de SPI-1 y SPI-2
- 2.- Definir si BarA/SirA regula la expresión de HilD a través del sistema Csr.
- 3.- Definir el mecanismo de regulación de *csrB* y *csrC* mediado por SirA.
- 4.- Definir qué secuencias de *ssrAB* son necesarias para su regulación mediada por HilD y H-NS.

4. METODOLOGÍA

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

4.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Los cultivos bacterianos fueron crecidos a 37 °C en el medio de cultivo LB que contiene 1% de Triptona, 0.5% de extracto de levadura y 1% de NaCl, a pH 7.5; o en medio mínimo N (MM-N) que contiene KCl 5 mM, (NH₄)₂SO₄ 7.5 mM, K₂SO₄ 0.5 mM, KH₂PO₄ 1 mM, Tris-HCl (pH 7.5) 100 mM, MgCl₂ 10 μM, glicerol 0.5% y casaminoácidos 0.1%. Cuando fue necesario, los medios fueron suplementados con antibióticos, según las dosis descritas en la tabla 4. Los cultivos bacterianos crecidos durante toda la noche en LB fueron concentrados y resuspendidos en medio LB fresco o en MM-N a una DO₆₀₀ de 1. Posteriormente se inocularon matraces con 50 ml de LB o MM-N con 1 ml de las suspensiones bacterianas y se incubaron a 37 °C en agitación a 200 rpm. Las muestras de los cultivos para la determinación de la actividad enzimática de CAT (cloranfenicol acetil transferasa), qRT-PCR o Western blot, fueron tomadas después de 5 h o 10 h de crecimiento en el medio LB, para los genes de SPI-1 o SPI-2, respectivamente. Las muestras para analizar el perfil de secreción proteica de SPI-1 fueron tomadas a las 9 horas de crecimiento en LB. Finalmente, cuando se empleó el MM-N para analizar la expresión de genes de SPI-2, las muestras fueron tomadas a las 16 horas de crecimiento en dicho medio. Estas condiciones han sido establecidas previamente para el estudio de la regulación de los genes de SPI-1 y SPI-2 (Bustamante *et al.*, 2008).

4.2. Construcción de plásmidos

Para construir los plásmidos que contienen las fusiones transcripcionales *sirA-cat*, *hilC-cat*, *rtsA-cat*, *csrB-cat* y *csrC-cat*, las regiones reguladoras de *sirA*, *hilC*, *rtsA*, *csrB* y *csrC* fueron amplificadas mediante PCR con los oligonucleótidos SirA-F/SirA-R, HilC-F/HilC-R, RtsA-F/RtsA-R, CsrB-F/CsrB-R y Csrc-F/Csrc-R, respectivamente (Tabla 3). Los productos de PCR de *csrB*, *hilC* y *rtsA/sirA/csrC* fueron digeridos con las enzimas de restricción *HindIII*, *SmaI/SalI*, y *BamHI/HindIII*, respectivamente, cuyos sitios de corte están contenidos dentro de los oligonucleótidos con los que fueron amplificados. Los

productos de PCR digeridos fueron clonados en el plásmido pKK232-8 (Tabla 2), un plásmido que contiene el gen reportero *cat* sin promotor (Amersham Pharmacia LKB Biotechnology), el cual fue digerido con las mismas enzimas de restricción usadas para la digestión de cada fragmento de PCR, generando así los plásmidos *psirA-cat1*, *philC-cat1*, *prtsA-cat1*, *pcsrB-cat1* y *pcsrC-cat1* (Tabla 2).

Para construir los plásmidos que contienen fusiones transcripcionales con recortes de la región reguladora de *csrB*, se amplificaron los diferentes recortes mediante PCR empleando los oligos *CsrB-F/CsrB-230Rv*, *CsrB-F/CsrB-170Rv*, *CsrB-F/CsrB-114Rv* y *CsrB-F/CsrB-50Rv* (Tabla 3). Estos fragmentos fueron digeridos con las enzimas *HindIII/BamHI* y posteriormente fueron clonados en el plásmido pKK232-8 (Tabla 2), que fue digerido con las mismas enzimas, generando así los plásmidos *pcsrB-cat-230*, *pcsrB-cat-170*, *pcsrB-cat-114* y *pcsrB-cat-50* (Tabla 2).

Para construir los plásmidos que contienen fusiones transcripcionales con recortes del operón *ssrAB*, se amplificaron los diferentes recortes mediante PCR empleando los oligos *SsaBF/SsrBR+478*, *SsaBF/SsrBR+336*, *SsaBF/SsrBR+304*, *SsaBF/SsrBR+240*, *SsaBF/SsrBR+210*, *SsaBF/SsrBR+119*, *SsaBF/SsrBR+69*, *SsaBF/SsrBR+10*, *SsrBR-208/SsrBR+478* y *SsrBR-106/SsrBR+478* (Tabla 3). Estos fragmentos fueron digeridos con las enzimas *BglII/SalI* y posteriormente fueron clonados en el plásmido pKK232-8 (Tabla 2), que fue digerido con las enzimas *BamHI/SalI*, generando así los plásmidos *pssrAB-cat+478*, *pssrAB-cat+336*, *pssrAB-cat+304*, *pssrAB-cat+240*, *pssrAB-cat+210*, *pssrAB-cat+119*, *pssrAB-cat+69*, *pssrAB-cat+10*, *pssrAB-cat-208* y *pssrAB-cat-106* (Tabla 2).

Para construir el plásmido pK3-SirA1 (Tabla 2), un fragmento de ADN que contiene el gen *sirA* fue amplificado mediante PCR usando los oligonucleótidos *SirA-FT3* y *SirA-RT3* (Tabla 3). Este producto de PCR fue digerido con las enzimas *HindIII* y *BamHI* y posteriormente fue ligado en el vector pMPM-K3 (Tabla 2), digerido con las mismas enzimas de restricción.

Para construir el plásmido pK3-SirAD54A (Tabla 2) se emplearon oligonucleótidos mutagénicos que contienen el cambio por alanina en el codón 54 de *sirA*. Primeramente, usando como templado el ADN cromosomal de *S. Typhimurium*, se hizo una primera ronda de PCR con los oligos *SirA-FT3/SirAD54A-R* y *SirAD54A-F/SirA-RT3* (Tabla 3). Los dos fragmentos de PCR obtenidos se purificaron y se mezclaron en cantidades iguales

para ser usados como templado para la segunda ronda de PCR empleando los oligonucleótidos SirA-FT3 y SirA-RT3 (Tabla 3), los cuales amplifican todo el gen *sirA*, que ahora contiene la mutación por alanina. Posteriormente este fragmento de ADN fue digerido con las enzimas *HindIII/BamHI* y se clonó en el vector pMPM-K3 (Tabla 2) que había sido digerido con las mismas enzimas.

Para construir los plásmidos pK3-CsrB1 y pK3-CsrA1 (Tabla 2), los oligonucleótidos CsrB-Fw2/CsrB-Rv2 y CsrA-F/CsrA-R (Tabla 3) fueron usados para amplificar un fragmento de ADN que contiene el gen *csrB* o *csrA*, respectivamente. Los fragmentos de PCR *csrB* y *csrA* fueron digeridos con las enzimas *KpnI/BamHI*, o *HindIII/BamHI*, respectivamente, y posteriormente fueron clonados en el vector pMPM-K3 (Tabla 2), digerido con las mismas enzimas de restricción. El plásmido pK3-CsrA1 (Tabla 2) fue digerido con las enzimas de restricción *HindIII/BamHI* para obtener un fragmento de ADN que contiene el gen *csrA*, el cual fue clonado en el vector pMPM-T3 (Tabla 2), digerido con las mismas enzimas de restricción para generar el plásmido pT3-CsrA1 (Tabla 2). Los plásmidos pK3-SirA1, pK3-SirAD54A, pT3-HilD1, pK3-CsrA1/pT3-CsrA1, pK3-CsrB1, pT3-OmpR1 expresan a SirA, HilD, CsrA, CsrB y OmpR, respectivamente, a partir del promotor *lac* del vector.

Para construir los plásmidos pBAD-SirA1 y pBAD-HilD1 (Tabla 2), los genes estructurales *sirA* y *hilD* fueron amplificados usando los pares de oligonucleótidos SirAHisA-F/SirAHisA-R y HilDMyR/HilDexF (Tabla 3), respectivamente. Los productos de PCR de *sirA* y *hilD* fueron digeridos con las enzimas *BglII/HindIII* y *BamHI/EcoRI*, respectivamente, y fueron clonados en los vectores pBADMyHisA y pBADMyHisC (Tabla 2) digeridos con las enzimas correspondientes. Los plásmidos pBAD-HilD1 y pBAD-SirA1, expresan a HilD y SirA, respectivamente, a partir del promotor inducible con arabinosa contenido en el vector.

Para construir el plásmido pMAL-SirA1 (Tabla 2), que expresa la proteína de fusión MBP-SirA, el gen estructural *sirA* fue amplificado mediante PCR usando los oligonucleótidos SirA-MALR y SirA-K6 (Tabla 3). El producto de PCR resultante fue digerido con las enzimas de restricción *HindIII/EcoRI* y fue clonado en el vector pMAL-c2X (Tabla 2) digerido con las mismas enzimas.

Para construir el plásmido pSR660-SirA (Tabla 2), que expresa la proteína de fusión LexA_{DBD}-SirA, se emplearon los oligonucleótidos SirAHisA-F y SirAR-LexA (Tabla

3) para amplificar el gen *sirA* y posteriormente este producto de PCR se digirió con las enzimas *BglII/KpnI* y se clonó en el vector pSR660 (Tabla 2) digerido con las mismas enzimas.

En todos los casos, se empleó ADN cromosomal de *S. Typhimurium* SL1344 (Tabla 1) como templado para las reacciones de PCR y una vez construidos los plásmidos fueron enviados a la unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología para obtener y verificar la secuencia de nucleótidos.

4.3. Construcción de cepas mutantes y cepas que expresan genes etiquetados con el epítipo FLAG

La mutagénesis se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner; 2000). La estrategia general se basó en reemplazar los genes *sirA*, *barA*, *csrB*, *csrC*, *csrA*, *himA* y *himD* en la cepa *S. Typhimurium* SL1344 (Tabla 1) y el gen *uvrY* en la cepa *E. coli* MC4100 (Tabla 1), con un gen seleccionable de resistencia a kanamicina que es generado por PCR utilizando oligonucleótidos que tienen 36 nucleótidos homólogos al gen que se desea remover (Tabla 3). En este procedimiento, la recombinación requiere la recombinasa del fago λ Red, la cual es sintetizada bajo el control de un promotor inducible en un plásmido de bajo número de copia (pKD46) (Tabla 2). De esta manera se generaron las cepas $\Delta sirA::km$, $\Delta barA::km$, $\Delta csrB::km$, $\Delta csrC::km$, $\Delta csrA::km$, $\Delta himA::km$, $\Delta himD::km$ y $\Delta uvrY::km$ (Tabla 1). Cuando se requirió, el cassette de resistencia a kanamicina que se insertó en las cepas mutantes o etiquetadas, fue eliminado empleando el plásmido pCP20 (Tabla 2) que expresa la recombinasa FLP, la cual reconoce directos repetidos FRT ("FLP recognition targets") que flanquean el gen de resistencia insertado, con lo que al llevarse a cabo la recombinación entre estos sitios, se pierde el cassette de resistencia (Datsenko and Wanner, 2000). De esta manera se generaron las cepas $\Delta hilD$, $\Delta sirA$, $\Delta ompR$, $\Delta ssrB$ y $\Delta csrB$ de *S. Typhimurium* y $\Delta uvrY$ de *E. coli* (Tabla 1). La cepa doble mutante $\Delta csrB \Delta csrC::km$ (Tabla 1) fue generada al introducir la delección $\Delta csrC::km$ en la cepa mutante $\Delta csrB$ (Tabla 1) mediante transducción con el fago P22. La cepa triple mutante $sirA::Tn10d \Delta csrB \Delta csrC::km$ (Tabla 1) fue generada al introducir la delección $sirA::Tn10d$ en la cepa doble mutante $\Delta csrB \Delta csrC::km$ (Tabla 1) mediante transducción con el fago P22.

El gen cromosomal *ssrB* fue etiquetado con el epítipo FLAG en la cepa *S. Typhimurium* SL1344 (Tabla 1), empleando una modificación del sistema del fago λ red para la mutagénesis, descrito previamente (Datsenko y Wanner; 2000). Esta modificación consiste en agregar en fase el epítipo FLAG al final del gen cromosomal que se quiere etiquetar, sustituyendo de esta manera el codón de término (Uzzau *et al.*, 2001). De esta manera, se generó la cepa WT *ssrB*-FLAG (Tabla 1). Posteriormente, esta etiqueta *ssrAB::3XFLAG-km*, así como la etiqueta *hilA::3XFLAG-km* de la cepa WT *hilA*-FLAG (Tabla 1), fueron transferidas a las cepas Δ *hilD* y Δ *sirA* (Tabla 1) mediante transducción con el fago P22, generando así las cepas Δ *hilD hilA*-FLAG, Δ *sirA hilA*-FLAG, Δ *hilD ssrB*-FLAG y Δ *sirA ssrB*-FLAG (Tabla 1). Todas las cepas mutantes fueron verificadas mediante PCR y secuenciación.

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

Muestras de 1 ml de cultivos, crecidos como se describe en el apartado de cepas bacterianas y condiciones de crecimiento, fueron centrifugadas 2 min a 12000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y las células se lavaron con 800 μ l de buffer TDTT (Tris-HCl-pH 7.8 50mM, 1,4-Ditiotreitol 30 μ M). Las pastillas de bacterias se resuspendieron en 1ml de buffer TDTT y se sonicaron durante 3 min en un sonicador "Vibra Cell" (Sonics and Materials, Inc), con pulsos de 9.9 s y reposo de 9.9 s entre cada pulso. Posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf nuevos.

Para cuantificar las proteínas totales, 10 μ l del extracto se colocaron por duplicado en una placa de 96 pozos (Costar). Se agregaron 200 μ l de una mezcla de reacción (25 ml solución A y 0.5 ml solución B) del estuche para cuantificación de proteínas "BCA Protein Assay Reagent" (Pierce). Las placas se incubaron durante 30 min a 37 °C y posteriormente se determinó la concentración de proteínas mediante la lectura de absorbancia a 562 nm en un lector automatizado de barrido para microplacas tipo CERES 900-C (Bio-Tek Instruments Inc) y el programa computacional KC3TM. Las lecturas obtenidas se interpolaron en una curva estándar de concentración de proteínas en μ g/ μ l, previamente leída y almacenada en el programa KC3.

La cuantificación de la actividad enzimática de CAT se determinó colocando por duplicado 5 μ l de cada extracto en una placa de 96 pozos. Se agregaron 200 μ l de una

solución que contiene Tris-HCl pH 7.8 0.1M, DTNB 1mM (ácido 5,5'ditio-bis (2--ácido nitrobenzoico) (Research Organics, Inc), cloranfenicol 0.1 mM (Sigma) y acetil Co-A 0.1 mM (Pharmacia Biotech). Posteriormente se determinó la cinética de expresión de CAT mediante la lectura de absorbancia a 410 nm en el mismo lector automatizado para microplacas, a intervalos de 5 s durante 5 min, posicionado en el modo de cinética.

Se utilizó una curva estándar (0 a 2500 U/ml) de actividad de la enzima CAT previamente leída y almacenada en el programa KC3, para interpolar las actividades de cada muestra. La actividad específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) se obtuvo al dividir las unidades de CAT entre la concentración de proteínas totales para cada extracto.

4.5. Inmunodetección de proteínas mediante “Western blot”

Muestras de 0.5 ml de cultivos, crecidos de acuerdo a lo descrito previamente en el apartado de cepas bacterianas y condiciones de crecimiento, se centrifugaron 3 min a 12000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas de bacterias fueron resuspendidas en 500 μl de amortiguador de carga SDS-PAGE1X. Estas muestras se calentaron a 92 °C durante 5 min y se visualizó el extracto de proteínas totales en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%, usando como amortiguador de corrida Tris-Glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0.1%).

Otro gel de los mismos extractos de proteínas se utilizó para la transferencia de éstas a una membrana de nitrocelulosa de poros de 0.45 μm (Millipore), en una cámara de transferencia semi-seca (Bio-Rad), usando amortiguador de transferencia (Tris 48 mM, Glicina 39 mM, metanol 20%, SDS 0.0375%) durante 1 hora a 15 V. Las membranas que contenían las proteínas transferidas fueron bloqueadas con leche desgrasada al 5% en PBST (PBS 1X, Tween 20 0.03%) durante una hora.

Posteriormente la membrana se incubó en agitación durante 4 horas con los anticuerpos monoclonales anti-FLAG M2 (SIGMA), anti-LexA (SIGMA) o anti-DNAK (StressGen), o el anticuerpo policlonal anti-SseB (Coombes *et al.*, 2004), diluidos en PBST 1:1000, 1:20000 y 1:2000, respectivamente. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó 3 veces con PBST en agitación durante 15, 5 y 5 minutos, respectivamente. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario anti-conejo (1:10000) conjugado con la enzima HRP (“horse-radish peroxidase”) (PIERCE) para detectar a los anticuerpos anti-SseB y anti-LexA y el anticuerpo anti-ratón (1:10000) (PIERCE) para detectar a DnaK y al

anticuerpo anti-FLAG. Las membranas se mantuvieron en agitación durante una hora. Se realizaron de nuevo tres lavados durante 15, 5 y 5 min respectivamente, con PBST en agitación.

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

4.6. Perfil de secreción de proteínas de SPI-1

Las cepas a estudiar se cultivaron en medio LB durante 10 horas. Muestras de 1.5 ml de los cultivos fueron concentradas por centrifugación durante 5 min a 14000 rpm y se transfirieron 1.3 ml del sobrenadante a tubos nuevos, se les agregaron 145 μ l de ácido tricloro acético al 100% (Mallinckrodtar) y se dejaron precipitando así durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente las proteínas precipitadas durante toda la noche se concentraron por centrifugación durante 30 min a 14000 rpm a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y las pastillas se disolvieron en 25 μ l de amortiguador de carga SDS-PAGE 1X y 2 μ l de Tris saturado pH 11. Las muestras se calentaron a 92 °C durante 5 min y fueron visualizadas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. Los geles fueron teñidos con colorante azul brillante de Coomassie (brilliant blue R-250).

4.7. Expresión y purificación de las proteínas MBP-SirA y MBP-HilD

La cepa *E. coli* BL21/DE3 (Tabla 1) que contiene los plásmidos pMAL-SirA1 o pMAL-HilD1 (Tabla 2) fue crecida en 100 ml de medio de cultivo LB a 37 °C hasta una DO₆₀₀ de 0.6, punto en el cual se indujo la expresión de MBP-SirA y MBP-HilD adicionando 1mM de IPTG (isopropil- β -D-thiogalactopiranosido). Cuatro horas después de la inducción, las células bacterianas fueron colectadas por centrifugación durante 10 min a 7000 rpm a 4 °C. La pastilla de células se lavó una vez con 20 ml de amortiguador de columna frío (Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM y β -mercaptoetanol 10 mM) y las células obtenidas se resuspendieron en 10 ml del mismo amortiguador de columna y se hicieron alícuotas de 1 ml para sonicarse durante 8 min, combinando pulsos de 10 s con descansos de 5 s en un sonicador “Soniprep 150 Sonicator” (Sonics and

Materials Inc.). Los restos celulares fueron separados por centrifugación a 13000 rpm durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se filtró empleando un filtro de 0.22 µm (Millipore).

En una columna desechable de 15 ml se empacaron 2 ml de resina de Amilosa (Biolabs), se lavó con 40 ml de agua miliQ estéril y después se equilibró con 30 ml de amortiguador de columna. El extracto soluble que contenía la proteína fusionada a MBP fue adicionado a la columna de amilosa y ésta fue lavada con 15 volúmenes de amortiguador de columna para remover las proteínas unidas inespecíficamente. Finalmente las proteínas unidas a la resina se eluyeron con amortiguador de columna adicionado con 10 mM de maltosa (Bioxon) y se colectaron fracciones de 1 ml. Estas fracciones colectadas se separaron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12% para determinar las fracciones que contenían la proteína purificada, así como para estimar su grado de pureza. Aquellas fracciones que contenían la proteína purificada fueron cargadas en un cassette para dialysis “Slide-A-Lyzer 7K cassette” (Pierce) y mantenidas dentro del cassette en agitación a 4 °C en un amortiguador de diálisis [Tris HCl pH 8 20 mM, KCl 40 mM, EDTA 1mM, DTT (1,4-Ditiotreitol) 1mM y glicerol 20% (v/v)]. Para cuantificar la concentración de proteína purificada se empleó el método Bradford usando el estuche comercial “Quick Start Bradford Protein Assay” (Bio-Rad). Las proteínas MBP-SirA y MBP-HilD purificadas se guardaron en alícuotas de 1 ml a -70°C.

4.8. Ensayos de retardamiento en gel (EMSA's, Electrophoretic Mobility Shift Assays) con ADN

Las regiones reguladoras de *hilD*, *hilC*, *csrB*, *csrC*, *hilA*, *ssrAB*, *sigD* y *sirA* fueron amplificadas mediante PCR usando el ADN chromosomal de *S. Typhimurium* SL1344 (Tabla 1) y los oligonucleótidos HilD-F/HilD-R, HilC-F/HilC-R, CsrB-F/CsrB-R, CsrC-F/CsrC-R, HilA-1F/HilA-2R, SsaBF/SsrBR+478 (Bustamante *et al.*, 2008), SigD-BH1F/SigD-H3R y SirA-FT3/SirAD54A-R, respectivamente (Tabla 3). Así mismo, empleando como templado el plásmido *pcsrB-cat1* (Tabla 2), fueron amplificados mediante PCR, los fragmentos de ADN de la región reguladora de *csrB* que abarcan las posiciones -230/+18 (*csrB-230*), -170/+18 (*csrB-170*) y -114/+18 (*csrB-114*) empleando los oligonucleótidos CsrB-F/CsrB-230Rv, CsrB-F/CsrB-170Rv y CsrB-F/CsrB-114Rv,

respectivamente (Tabla 3). Los fragmentos de ADN de la región reguladora de *ssrAB* que abarcan las posiciones -302/+478 (*ssrAB*+478), -302/-111 (*ssrAB*+478A), -161/+37 (*ssrAB*+478B), -12/+186 (*ssrAB*+478C), +136/+336 (*ssrAB*+478D) y +307/+478 (*ssrAB*+478E), fueron amplificados empleando el plásmido *pssrAB*-cat+478 (Tabla 2) como templado y los oligos *SsABF*/*SsrAB*-11aR, *SsrAB*-11bF/*SsrAB*-11bR, *SsrAB*-11cF/*SsrAB*-11cR, *SsrAB*-11dF/*SsrAB*-11dR y *SsrAB*-11eF/*SsrBR*+478, respectivamente (Tabla 3). En algunos casos los productos de PCR fueron marcados durante la reacción usando oligonucleótidos marcados con ^{32}P en el extremo 5'. Los productos de PCR fueron purificados usando el estuche comercial "QIAquick PCR purification" (Qiagen). Aproximadamente 100 ng de cada uno de los diferentes fragmentos de ADN y 100 ng de los fragmentos de *sigD* o *sirA* (controles negativos) se incubaron con concentraciones crecientes de las proteínas purificadas MBP-SirA, MBP-HilD, IHF o HNS-FLAG-His según el caso, en un volumen total de 20 μl . Las reacciones de retardamiento para MBP-SirA, MBP-HilD y HNS-FLAG-His fueron realizadas en el amortiguador de unión que contiene Tris-HCl pH 8 10 mM, KCl 50 mM, DTT (1,4-Ditiotreitol) 1 mM, 0.5 mM EDTA, glicerol 5% y BSA 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Las reacciones de retardamiento para IHF fueron realizadas en el amortiguador de unión que contiene HEPES (4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinetanosulfónico) 40 mM, MgCl_2 8 mM, KCl 50 mM, DTT (1,4-Ditiotreitol) 1 mM, Nonidet P-40 (NP40, (octil fenoxipolietoxiletanol) 0.05% y BSA 0.1mg/ml. Cuando se empleó la proteína MBP-SirA fosforilada, ésta se fosforiló mediante la incubación con 100 mM de acetil fosfato (Sigma) durante 3 horas a temperatura ambiente, según lo reportado previamente (Kenney *et al.*, 1995). Las interacciones se realizaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y posteriormente los complejos proteína-ADN se separaron en un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones no desnaturizantes en amortiguador de corrida Tris-boratos-EDTA 0.5X.

Para los EMSAs competitivos, primero 100 ng de los fragmentos *csrB* o *csrC* marcados con ^{32}P , se incubaron con una concentración constante de 3 μM de MBP-SirA durante 20 min a temperatura ambiente en el amortiguador de unión usado para los EMSAs con MBP-SirA. Posteriormente, a la mezcla se adicionaron concentraciones crecientes de *csrB*, *csrC* o *sigD* no marcados radioactivamente y se dejaron incubando 20 minutos más a temperatura ambiente. Los complejos proteína-ADN se separaron en un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones no desnaturizantes en amortiguador de

corrida Tris-boratos-EDTA 0.5X. Para la visualización de los complejos ADN-proteína, aquellos geles con fragmentos de ADN no marcados radioactivamente, se tiñeron con una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml y se visualizaron en un transiluminador con luz UV de onda corta (Alpha-Imager UV transilluminator Innotech Corp.). Los complejos ADN-proteína con fragmentos marcados con ^{32}P , fueron detectados exponiéndolos a películas radiográficas (KODAK-Omat-LS-film).

4.9. RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR)

El ARN total de *S. Typhimurium* SL1344 (Tabla 1) y sus derivadas mutantes fue purificado a partir de muestras de cultivos crecidos en el medio de cultivo LB a 37 °C durante 5 h, empleando el estuche comercial “RNeasy Mini Kit” (Qiagen). El ADN cromosomal fue removido incubando 2 µg de ARN de cada cepa con 2 µl de DNasa I (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El cDNA fue sintetizado en una reacción que contiene 0.5 µg de cada ARN tratado con DNasa y 5 pmol de los oligonucleótidos HiiD-RT-R (para *hiiD*) y DnaK-RT-R (para *dnaK*), empleando el estuche comercial “Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis” (Fermentas). Las reacciones de qRT-PCR se realizaron en un volumen final de 20 µl que contiene 5 ng/µl del cDNA, 5 pmol de los pares de oligonucleótidos para *hiiD* o *dnaK* (HiiD-RT-F/HiiD-RT-R o DnaK-RT-F/DnaK-RT-R, respectivamente) (Tabla 3) y 10 µl de la mezcla comercial “SYBR Green PCR Master Mix” (Perkin-Elmer/Applied Bio-systems). Las reacciones fueron realizadas empleando un termociclador “ABI Prism 7000 Sequence Detection System” (Applied Bio-systems) y los datos fueron analizados con el programa computacional “Rotor Gene 6000 series 1.7”. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 10 min a 95 °C, y 40 ciclos a 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 60 s. Los niveles del ARNm de *dnaK* fueron usados como control interno para normalizar los resultados obtenidos para el ARNm de *hiiD*. El método de cuantificación usado para analizar los datos fue el $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Todas las reacciones de PCR fueron realizadas por triplicado y se repitieron empleando ARN purificado a partir de 3 diferentes cultivos bacterianos.

4.10. Ensayos de retardamiento en gel (EMSA, Electrophoretic Mobility Shift Assays) con ARN

Los EMSAs con ARN se realizaron de acuerdo a trabajos previamente reportados (Baker *et al.*, 2007; Yakhnin *et al.*, 2007). La proteína CsrA-His (CsrA-H6) de *E. coli* fue purificada como se ha descrito previamente (Dubey *et al.*, 2005). El ARN fue sintetizado *in vitro* usando el estuche comercial “RNA Maxx Transcription” (Stratagene). Los fragmentos de PCR empleados como templado para las reacciones de transcripción contienen el promotor T7 y las secuencias de *hilA*, *hilD*, *ssrAB* o *csrB* que abarcan las posiciones +1 a +365, +1 a +89, +1 a +183 o +1 a +371, respectivamente, con respecto al inicio de transcripción. El ARN purificado fue marcado con [γ - 32 P]-ATP en su extremo 5'. El ARN resuspendido en amortiguador Tris-EDTA fue calentado a 90 °C durante 1 min seguido de un enfriamiento lento a temperatura ambiente. Las reacciones de unión se realizaron en un volumen final de 10 μ l que contiene Tris-HCl pH 7.5 10 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 100 mM, ARN de levadura 200 ng/ μ l, BSA 0.2 mg/ml, glicerol 7.5%, DTT (1,4-Ditiotreitol) 20 mM, ARN 10-500 pM, xilen cianol 0.1 mg/ml, la proteína CsrA-H6 (varias concentraciones), y ARN no marcado como competidor. Las mezclas de reacción fueron incubadas durante 30 min a 37 °C. Las muestras fueron separadas en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% usando TBE 0.5X como amortiguador de corrida. Las bandas radioactivas fueron visualizadas con un “phosphorimager” y cuantificadas usando el programa computacional “ImageQuant 5.2”. Las constantes de disociación aparentes (K_d) de las interacción CsrA-ARN fueron calculadas como se ha descrito previamente (Yakhnin *et al.*, 2000).

4.11. Ensayos de protección a la ARNasa (RNA footprints)

Los ensayos de protección a la ARNasa fueron realizados de acuerdo a la técnica descrita previamente (Baker *et al.*, 2007; Yakhnin *et al.*, 2007). Las reacciones de unión se realizaron en un volumen total de 10 μ l de manera idéntica a las descritas para los EMSAs con ARN, pero conteniendo varias concentraciones de CsrA-H6 y 5 nM del ARN de *hilD* o *ssrAB*. Después de la reacción de unión inicial, se agregaron 0.03 U de ARNasa T1 (Fermentas) y la incubación se continuó durante 15 min a 37 °C. Las reacciones se detuvieron agregando 10 μ l de amortiguador de carga (EDTA pH 8.0 0.37%, azul de bromofenol 0.3% y xilen cianol en formamida 95%) y colocándolas en hielo. La hidrólisis alcalina parcial y las digestiones con ARNasa T1 de cada transcrito fueron preparadas como se ha descrito previamente (Bevilacqua y Bevilacqua, 1998). Las muestras fueron

separadas en un gel de poliacrilamida para secuenciación estándar al 6%. Las bandas radioactivas fueron visualizadas con un “phosphorimager”.

4.12. Extracción de ARN, “Northern blot” y determinación de la vida media de los transcritos

Para determinar la vida media del ARNm de *hilD*, las cepas *S. Typhimurium* WT y $\Delta csrA::km$ (Tabla 1) que contienen el plásmido pT3-HilD1 (Tabla 2) fueron crecidas en el medio LB hasta alcanzar una DO_{600} de 0.6, tiempo en el cual se agregaron 200 $\mu\text{g/ml}$ de rifampicina a los cultivos para detener el inicio de la transcripción. El ARN total fue purificado de muestras tomadas a los 0, 0.5, 1, 2 y 4 min después de la adición de rifampicina mediante el método de extracción con fenol caliente descrito previamente (Georgellis *et al.*, 1992).

Los análisis de “Northern blot” fueron realizados mediante la separación de las muestras de ARN purificadas (20 μg) en un gel de agarosa 1%-formaldehído, el cual fue transferido a una membrana de nitrocelulosa por transferencia capilar. El ARN fue fijado en las membranas mediante un aparato de “crosslinking” (Stratalinker, Stratagene), y prehibridadas durante 3 h a 42 °C en un amortiguador que contiene solución Denhardt’s 5X, SSC 5X, SDS 0.2%, formamida 50%, y 250 μg de ADN de esperma de salmón. Posteriormente, una sonda de ADN específica de *hilD* marcada radioactivamente, desnaturalizada a 90 °C durante 5 min, se agregó al amortiguador de prehibridación y las membranas fueron incubadas a 42 °C toda la noche. La sonda *hilD* específica fue obtenida al digerir el plásmido pT3-HilD1 (Tabla 2) con las enzimas *SalI/BamHI*, separando los fragmentos en geles de agarosa y purificando la banda específica de *hilD* empleando el estuche comercial “Qiagen Agarose Purification” (Qiagen). El marcado de la sonda se realizó empleando [α - ^{32}P]dCTP y el estuche comercial “Rediprime II” (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las membranas fueron lavadas dos veces con 50 ml de SSC 2X y SDS 0.1% a 42 °C, y dos veces con SSC 0.2X y SDS 0.1% a 42 °C. Las imágenes se obtuvieron usando un “Phosphorimager” y fueron analizadas empleando un escáner “Typhoon image” (Amersham). La determinación de la vida media del ARNm de *hilD* fue realizada como se ha descrito previamente (von Gabain *et al.*, 1983).

4.13. Ensayos de protección a la DNAsa (DNA footprints)

El plásmido pcsrB-cat1 fue usado como templado para amplificar mediante PCR la región reguladora de *csrB* empleando los oligonucleótidos *csrB*-F y *csrB*-R. Para la protección con la proteína MBP-SirA, el oligonucleótido *csrB*-R complementario a la secuencia 5' de *csrB* (5'—3') (Tabla 3) se marcó con ^{32}P , mientras que el oligonucleótido *csrB*-F fue marcado con ^{32}P para realizar la protección con la proteína IHF. Cada ensayo contenía 5×10^4 cpm (0.16 pmol) de templado marcado con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y cinasa, y fue incubado a temperatura ambiente en 30 μl de Tris-HCl pH 8 10 mM, KCl 50 mM, DTT (1,4-Ditiotreitol) 1 mM, 0.5 mM EDTA, glicerol 5%, BSA 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y 1.0 μg de poli(dI-dC) (Boehringer)/ml cuando la protección fue hecha con MBP-SirA, y en HEPES (4-(2-hidroxiethyl)-1-ácido piperazinetanosulfónico) 40 mM, MgCl_2 8 mM, KCl 50 mM, DTT (1,4-Ditiotreitol) 1 mM, Nonidet P-40 (NP40, (octil fenoxipolietoxiletanol) 0.05%, BSA 0.1mg/ml y 1.0 μg de poli(dI-dC) (Boehringer)/ml cuando la protección fue hecha empleando la proteína IHF. Los segmentos de ADN fueron separados por electroforesis en geles de acrilamida al 8%—urea 8 M.

4.14. Ensayos de dimerización

El sistema genético de bacterias basado en LexA fue empleado para monitorear las interacciones proteína-proteína (SirA-SirA) de acuerdo a como se ha descrito previamente (Dmitrova *et al.*, 1998; Daines y Silver, 2000). El plásmido pSR658-HNS, que codifica una proteína H-NS fusionada al dominio de unión al ADN de LexA (LexA_{DBD} -HNS), fue empleado como control positivo (Bustamante, no publicado) (Tabla 2). Los plásmidos pSR660-SirA y pSR658-HNS (Tabla 2), fueron introducidos por separado en la cepa *E. coli* SU101 (Tabla 1), la cual se usa como cepa reportera para monitorear la capacidad de las proteínas de fusión para formar dímeros funcionales de LexA, con la capacidad de reprimir la expresión de una fusión cromosomal *sulA::lacZ* (Dmitrova *et al.*, 1998). Las cepas se cultivaron durante toda la noche en medio LB con 10 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina a 37°C y al otro día se subcultivaron en LB suplementado con 1 mM de IPTG. Las muestras fueron colectadas a una OD_{600} de 0.6 y fueron empleadas para cuantificar β -galactosidasa como se ha descrito previamente (Oropeza *et al.*, 1999).

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo

Cepa	Descripción	Origen o referencia
<u>S. Typhimurium:</u>		
WT	Cepa silvestre SL1344, <i>xyl</i> , <i>hisG</i> , <i>rpsL</i> ; Str ^R	Hoiseth y Stocker, 1981
JPTM5	Derivada de SL1344; Δ <i>hilD</i> ::km; Str ^R Km ^R	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
JPTM25	Derivada de Δ <i>hilD</i> ::km; Δ <i>hilD</i> ; Str ^R	Este trabajo
JPTM23	Derivada de SL1344; Δ <i>sirA</i> ::km; Str ^R Km ^R	Este trabajo
CJO35	Derivada de SL1344; <i>sirA</i> ::Tn10d; Str ^R Tet ^R	Johnston <i>et al.</i> , 1996
JPTM27	Derivada de Δ <i>sirA</i> ::km; Δ <i>sirA</i> ; Str ^R	Este trabajo
JPTM3	Derivada de SL1344; Δ <i>ompR</i> ::km; Str ^R Km ^R	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
JPTM28	Derivada de Δ <i>ompR</i> ::km; Δ <i>ompR</i> ; Str ^R	Este trabajo
MJW112	Derivada de SL1344; Δ <i>ssrB</i> ::km; Str ^R Km ^R	M. Worley y F. Heffron
JPTM29	Derivada de Δ <i>ssrB</i> ::km; Δ <i>ssrB</i> ; Str ^R	Este trabajo
JPTM39	Derivada de SL1344; Δ <i>barA</i> ::km; Str ^R Km ^R	Este trabajo
JPTM40	Derivada de SL1344; Δ <i>csrB</i> ::km; Str ^R Km ^R	Este trabajo
JPTM42	Derivada de Δ <i>csrB</i> ::km; Δ <i>csrB</i> ; Str ^R	Este trabajo
JPTM41	Derivada de SL1344; Δ <i>csrC</i> ::km; Str ^R Km ^R	Este trabajo
JPTM43	Derivada de Δ <i>csrC</i> ::km; Δ <i>csrB</i> Δ <i>csrC</i> ::km; Str ^R Km ^R	Este trabajo
JPTM45	Derivada de Δ <i>csrB</i> Δ <i>csrC</i> ::km; Δ <i>csrB</i> Δ <i>csrC</i> ::km <i>sirA</i> ::Tn10d; Str ^R Km ^R Tet ^R	Este trabajo
JPTM44	Derivada de SL1344; Δ <i>csrA</i> ::km; Str ^R Km ^R	Este trabajo
JPTM36	Derivada de SL1344; <i>hilA</i> ::3XFLAG-km; Str ^R Km ^R	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
JPTM38	Derivada de Δ <i>sirA</i> ; <i>hilA</i> ::3XFLAG-km Δ <i>sirA</i> ; Str ^R Km ^R	Este trabajo
JPTM37	Derivada de Δ <i>hilD</i> ; <i>hilA</i> ::3XFLAG-km Δ <i>hilD</i> ; Str ^R Km ^R	Este trabajo
JPTM30	Derivada de SL1344; <i>ssrB</i> ::3XFLAG-km; Str ^R Km ^R	Este trabajo
JPTM32	Derivada de Δ <i>hilD</i> ; <i>ssrB</i> ::3XFLAG-km Δ <i>hilD</i> ; Str ^R Km ^R	Este trabajo

JPTM34	Derivada de $\Delta sirA$; $ssrB::3XFLAG$ -km $\Delta sirA$; Str ^R Km ^R	Este trabajo
JPTM46	Derivada de SL1344; $\Delta himA::km$; Str ^R Km ^R	Este trabajo
JPTM47	Derivada de SL1344; $\Delta himD::km$; Str ^R Km ^R	Este trabajo
<i>E. coli:</i>		
MC4100	Derivada de K12, cepa silvestre de laboratorio; Str ^R	Casadaban, 1976
BL21/DE3	Cepa para expresar proteínas recombinantes	Invitrogen
DH5 α	Cepa de laboratorio; Nal ^R	Invitrogen
DH10 β	Cepa de laboratorio; Str ^R	Invitrogen
JPMC46	Derivada de MC4100; $\Delta uvrY::km$; Str ^R Km ^R	Este trabajo
JPMC47	Derivada de $\Delta uvrY::km$; $\Delta uvrY$; Str ^R	Este trabajo
JPMC1	Derivada de MC4100; $\Delta hns::km$; Str ^R Km ^R	Barba <i>et al.</i> , 2005
SU101	JL 1434 <i>lexA71::Tn5</i> (Def) <i>sulA211</i> (<i>lacIPOZYA</i>) 169/F' <i>lacI</i> ^R <i>lacZ</i> Δ M15::Tn9 (op ⁺ /op ⁺)	Dmitrova <i>et al.</i> , 1998

Tabla 2. Plásmidos empleados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Origen o referencia
pKK232-8	Derivado de pBR322, contiene el gen <i>cat</i> (cloranfenicol acetil transferasa) sin promotor; Amp ^R	Brosius, 1984
philA-cat1	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilA-cat</i> , que lleva la región -410 a +446, con respecto al sitio de inicio de transcripción de <i>hilA</i> .	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
philC-cat1	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilC-cat</i> , que lleva la región -373 a +79, con respecto al sitio de inicio de transcripción de <i>hilC</i> .	Este trabajo
philD-cat1	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilD-cat</i> , que lleva la región -364 a +88, con respecto al inicio de transcripción de <i>hilD</i> .	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
pcsrB-cat1	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión	Este trabajo

	transcripcional <i>csrB-cat</i> , que lleva la región -372 a +18, con respecto al sitio de inicio de la traducción de <i>csrB</i> .	
pcsrB-cat-230	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrB-cat</i> , que lleva la región -230 a +18, con respecto al sitio de inicio de la traducción de <i>csrB</i> .	Este trabajo
pcsrB-cat-170	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrB-cat</i> , que lleva la región -170 a +18, con respecto al sitio de inicio de la traducción de <i>csrB</i> .	Este trabajo
pcsrB-cat-114	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrB-cat</i> , que lleva la región -114 a +18, con respecto al sitio de inicio de la traducción de <i>csrB</i> .	Este trabajo
pcsrB-cat-50	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrB-cat</i> , que lleva la región -50 a +18, con respecto al sitio de inicio de la traducción de <i>csrB</i> .	Este trabajo
pcsrC-cat1	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>csrC-cat</i> , que lleva la región -351 a +63, con respecto al sitio de inicio de la traducción de <i>sirA</i> .	Este trabajo
psirA-cat1	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>sirA-cat</i> , que lleva la región -563 a +98, con respecto al sitio de inicio de la traducción de <i>sirA</i> .	Este trabajo
prtsA-cat1	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>rtsA-cat</i> , que lleva la región -465 a +97, con respecto al inicio de traducción de <i>rtsA</i> .	Este trabajo
pssaG-cat1	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssaG-cat</i> , que lleva la región -232 a +361, con respecto al inicio de transcripción de <i>ssaG</i> .	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
pssrAB-cat1	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssrAB-cat</i> , que lleva la región -302 a +3054, con respecto al inicio de	Bustamante <i>et al.</i> , 2008

	transcripción de <i>ssrAB</i> .	
pssrAB-cat+478	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssrAB-cat</i> , que lleva la región -302 a +478, con respecto al inicio de transcripción de <i>ssrAB</i> .	Este trabajo
pssrAB-cat+336	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssrAB-cat</i> , que lleva la región -302 a +336, con respecto al inicio de transcripción de <i>ssrAB</i> .	Este trabajo
pssrAB-cat+304	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssrAB-cat</i> , que lleva la región -302 a +304, con respecto al inicio de transcripción de <i>ssrAB</i> .	Este trabajo
pssrAB-cat+240	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssrAB-cat</i> , que lleva la región -302 a +240, con respecto al inicio de transcripción de <i>ssrAB</i> .	Este trabajo
pssrAB-cat+210	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssrAB-cat</i> , que lleva la región -302 a +210, con respecto al inicio de transcripción de <i>ssrAB</i> .	Este trabajo
pssrAB-cat+119	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssrAB-cat</i> , que lleva la región -302 a +119, con respecto al inicio de transcripción de <i>ssrAB</i> .	Este trabajo
pssrAB-cat+69	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssrAB-cat</i> , que lleva la región -302 a +69, con respecto al inicio de transcripción de <i>ssrAB</i> .	Este trabajo
pssrAB-cat+10	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssrAB-cat</i> , que lleva la región -302 a +10, con respecto al inicio de transcripción de <i>ssrAB</i> .	Este trabajo
pssrAB-cat-208	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>ssrAB-cat</i> , que lleva la región -208 a +478, con respecto al inicio de transcripción de <i>ssrAB</i> .	Este trabajo
pssrAB-cat-106	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión	Este trabajo

	transcripcional <i>ssrAB-cat</i> , que lleva la región -106 a +478, con respecto al inicio de transcripción de <i>ssrAB</i> .	
pMPM-T3	Vector de clonación de bajo número de copias; origen p15A; contiene el promotor <i>lac</i> ; Tet ^R	Mayer, 1995
pMPM-K3	Vector de clonación de bajo número de copias; origen p15A; contiene el promotor <i>lac</i> ; Km ^R	Mayer, 1995
pT3-HilD1	Derivado de pMPM-T3; contiene el gen estructural <i>hilD</i> y el sitio de unión a ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> .	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
pT3-CsrA1	Derivado de pMPM-T3; contiene el gen estructural <i>csrA</i> y el sitio de unión a ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> .	Este trabajo
pT3-OmpR1	Derivado de pMPM-T3; contiene el gen estructural <i>ompR</i> y el sitio de unión a ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> .	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
pK3-SirA1	Derivado de pMPM-K3; contiene el gen estructural <i>sirA</i> y el sitio de unión a ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> .	Este trabajo
pK3-SirAD54A	Derivado de pMPM-K3; contiene el gen estructural <i>sirA</i> con la mutación D54A y el sitio de unión a ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> .	Este trabajo
pK3-CsrB1	Derivado de pMPM-K3; contiene el gen estructural <i>csrB</i> y el sitio de unión a ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> .	Este trabajo
pK3-CsrA1	Derivado de pMPM-K3; contiene el gen estructural <i>csrA</i> y el sitio de unión a ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> .	Este trabajo
pBADMycHisA	Vector de expresión, contiene el promotor de arabinosa y la secuencia que codifica 6xhistidinas y el epítipo Myc	Invitrogen
pBADMycHisC	Vector de expresión, contiene el promotor de arabinosa y la secuencia que codifica 6xhistidinas y el epítipo Myc	Invitrogen
pBADHilD1	Derivado de pBADMycHisA, contiene el gen	Este trabajo

	estructural <i>hiiD</i> , bajo el control del promotor <i>ara</i> .	
pBADSirA1	Derivado de pBADMyHisA, contiene el gen estructural <i>sirA</i> , bajo el control del promotor <i>ara</i> .	Este trabajo
pKD4	Derivado de pANTS γ ; contiene el gen de resistencia a Km, flanqueado por FRT's.	Datsenko y Wanner, 2000
pKD46	Derivado de pINT-ts, contiene el sistema de recombinación del fago λ Rojo bajo el control de un promotor inducible por arabinosa; Amp ^R	Datsenko y Wanner, 2000
pCP20	Plásmido de replicación termo-sensible e inducción térmica de la síntesis de la recombinasa FLP.	Cherepanov y Wackerangel, 1995
pSUB11	Derivado de pGP704, contiene el gen de resistencia a kanamicina y la secuencia completa del epítipo 3Xflag	Uzzau <i>et al.</i> , 2001
pMAL-c2X	Vector para construcción de fusiones a la proteína MBP; Amp ^R	New England Biolabs
pMAL-SirA1	Derivado del pMAL-c2X; expresa la proteína de fusión MBP-SirA; Amp ^R	Este trabajo
pMAL-HiiD1	Derivado del pMAL-c2X; expresa la proteína de fusión MBP-HiiD; Amp ^R	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
pCSB12	Derivado del pET21a+; expresa la proteína CsrA-H6	Dubey <i>et al.</i> , 2005
pMPM-T6 Ω	Vector de clonación de bajo número de copias; origen p15A; contiene un promotor unducible con arabinosa; Tet ^R	Mayer, 1995
pT6-HNS-His ₆	Derivado de pMPM-T6 Ω ; contiene el gen estructural <i>hns</i> y el sitio de unión a ribosoma bajo el control de un promotor inducible con arabinosa.	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
pSR660	Vector que codifica la secuencia LexA DBD usada para dimerización; Tc ^r <i>oriV</i>	Daines y Silver, 2000
pSR660-SirA	Derivado del pSR660, contiene la fusión <i>lexA</i> _{DBD} - <i>sirA</i>	Este trabajo
pSR658-HNS	Derivado del pSR658, contiene la fusión <i>lexA</i> _{DBD} - <i>hns</i>	Bustamante, no publicado

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Nombre	Secuencia	Modificación
Construcción de la fusión <i>hilA-cat</i>		
HilA-1F	5'- ATC <u>GGA TCC</u> CTC TGA GAA CTA TTT GC -3'	<i>Bam</i> HI
HilA-2R	5'- GAC <u>AAG CTT</u> TTC TGA GCG TAG CAG GG -3'	<i>Hind</i> III
Construcción de la fusión <i>hilD-cat</i>		
HilD-R	5'- CTG <u>AAG CTT</u> ATC TGC GGC AGG ACG C -3'	<i>Hind</i> III
HilD-F	5'- AAT <u>GGA TCC</u> TCA CAG CCG TTC AGT GAG -3'	<i>Bam</i> HI
Construcción de la fusión <i>hilC-cat</i>		
HilC-R	5'- GGC <u>TGT CGA CGG</u> TGA TTA TTG CTA ATG GC -3'	<i>Sa</i> II
HilC-F	5'- ACC <u>CCC GGG</u> ATG CAG GAG ATT ATT TTA TC -3'	<i>Sma</i> I
Construcción de la fusión <i>sirA-cat</i>		
SirA-F	5'- GCC <u>GGA TCC</u> ATC GCC TGC AGC ATC AGC -3'	<i>Bam</i> HI
SirA-R	5'- AGC <u>AAG CTT</u> CAC CGA CAA CTT TAA TGC -3'	<i>Hind</i> III
Construcción de la fusión <i>rtsA-cat</i>		
RtsA-F	5'- CAA <u>GGA TCC</u> GGA TAT GCG TAC ACC GTC -3'	<i>Bam</i> HI
RtsA-R	5'- CCC <u>AAG CTT</u> GAT AAG GAT TTC CTC TGC CAG -3'	<i>Hind</i> III
Construcción de la fusión <i>csrB-cat</i>		
CsrB-F	5'- TTC <u>AAG CTT</u> CGA CTC CCT GTC GAC GAA G -3'	<i>Hind</i> III
CsrB-R	5'- TAG GCC ACC TGG TCA CGC -3'	
Construcción de la fusión <i>csrC-cat</i>		
CsrC-F	5'- CTT <u>CGG ATC CGC</u> AAT CGG AAG GTA AAT GG -3'	<i>Bam</i> HI
CsrC-R	5'- CTT <u>GAA GCT TCG</u> CCT CCT GGC GCT CC -3'	<i>Hind</i> III
Construcción de las fusiones con recortes de <i>csrB-cat</i>		
CsrB-F	5'- TTC <u>AAG CTT</u> CGA CTC CCT GTC GAC GAA G -3'	<i>Hind</i> III
CsrB-230Rv	5'- AAT <u>GGA TCC</u> CGC AAC TTA ATC CTC TTC TG -3'	<i>Bam</i> HI
CsrB-170Rv	5'- TCT <u>GGA TCC</u> GTC TGT AGG AGA TCG CCA GG -3'	<i>Bam</i> HI
CsrB-114Rv	5'- CTT <u>GGA TCC</u> GTC TAT ATA AAA CAA CTA ATT AAA ATG -3'	<i>Bam</i> HI
CsrB-50Rv	5'- CTT <u>GGA TCC</u> TTG TCT GTA AGC GTC TTG TAA G -3'	<i>Bam</i> HI
Construcción de las fusiones con recortes de <i>ssrAB-cat</i>		
SsaBF	5'- GGC <u>TAA GAT CTT</u> CGG CCC TGA TAT CCT G -3'	<i>Bgl</i> II
SsrBR+478	5'- TTG <u>GTC GAC</u> CGA CAG ATA GAT GCC GG -3'	<i>Sa</i> II
SsrBR+336	5'- ATT <u>GTC GAC</u> GGA TAG AAC GGA TAA ATC CTC -3'	<i>Sa</i> II
SsrBR+304	5'- TAT <u>GTC GAC</u> CCG TTT CTG AAC CAT TGA TAT A -3'	<i>Sa</i> II

SsrBR+240	5'- ATT <u>GTC GAC</u> GTT AAT AAA AAT AAA AAA GTT AGC C -3'	<i>SalI</i>
SsrBR+210	5'- CCT <u>GTC GAC</u> TAA AGA TGT TTG CAG CGT -3'	<i>SalI</i>
SsrBR+119	5'- ACT <u>TGT CGA</u> CTA TCG CAG TAC ATA TAG TTT C -3'	<i>SalI</i>
SsrBR+69	5'- TGT <u>GTC GAC</u> TAG GAA GAT AAA TTT CTT CAT ATA TAA C -3'	<i>SalI</i>
SsrBR+10	5'- CTT <u>TGT CGA</u> CAG ATG GCG ATG TAA AAA CAT CG -3'	<i>SalI</i>
SsrBR-208	5'- CAA <u>AAG ATC</u> TCA CAA CCA CAT CCG TAA AA -3'	<i>BglII</i>
SsrBR-106	5'- AGG <u>CAG ATC</u> TAT CAT TCG GAT TTT CCG AT -3'	<i>BglII</i>
Construcción de plásmido pBADSirA1 y el plásmido pSR660-SirA		
SirAHisA-F	5'- TTA <u>GAT CTA</u> TCA ACG TTC TTC TTG TTG ATG -3'	<i>BglII</i>
SirAHisA-R	5'- TTT <u>AAG CTT</u> CTG GCT TGT TAA CGT CTC CG -3'	<i>HindIII</i>
SirAR-LexA	5'- GAA <u>GGT ACC</u> TTT TTC AGG TCT TTT GCT TTA C -3'	<i>KpnI</i>
Construcción de plásmido pBADHiD1		
HilDexF	5'- GAT <u>GGA TCC</u> GAA AAT GTA ACC TTT GTA AGT AAT AG -3'	<i>BamHI</i>
HilDMyR	5'- AAA <u>GAA TTC</u> ATG GTT CGC CAT TTT TAT G -3'	<i>EcoRI</i>
Construcción del plásmido pK3-SirA1		
SirA-FT3	5'- CAT <u>AAG CTT</u> CAA AAA CGA GAG CAA AAT CG -3'	<i>HindIII</i>
SirA-RT3	5'- TAA <u>GGA TCC</u> GTA CCG CCG GCG TCA TAC -3'	<i>BamHI</i>
Construcción de plásmido pK3-SirAD54A		
SirA-FT3	5'- CAT <u>AAG CTT</u> CAA AAA CGA GAG CAA AAT CG -3'	<i>HindIII</i>
SirA-RT3	5'- TAA <u>GGA TCC</u> GTA CCG CCG GCG TCA TAC -3'	<i>BamHI</i>
SirAD54A-F	5'- GAC GTC GTG CTG ATG <u>GCG</u> ATG AAC ATG CCC GGT AT -3'	Alanina
SirAD54A-R	5'- ATA CCG GGC ATG TTC ATC <u>GCC</u> ATC AGC ACG ACG TC -3'	Alanina
Construcción de plásmido pMAL-SirA1		
SirA-K6	5'- GGA <u>GAA TTC</u> ACC ATG ATC AAC GTT CTT CTT GTT GAT G -3'	<i>EcoRI</i>
SirA-MALR	5'- CAT <u>AAG CTT</u> GAC ACC GGG TTG GCT GGT AAC -3'	<i>HindIII</i>
Construcción de plásmido pK3-CsrB1		
CsrB-Fw2	5'- CGA <u>TGG TAC</u> CTT CGT CGA CAG GG -3'	<i>KpnI</i>
CsrB-Rv2	5'- CGG <u>CGG ATC</u> CTG CCG CCA GTG -3'	<i>BamHI</i>
Construcción de los plásmidos pT3-CsrA1 y pK3-CsrA1		
CsrA-F	5'- CCT <u>AAG CTT</u> TTT GTC ATC GCT TAC TTT TTG G -3'	<i>HindIII</i>
CsrA-R	5'- GCT <u>GGA TCC</u> CAA AAG CGC ACC ATA TCA AC -3'	<i>BamHI</i>
Construcción de la mutante $\Delta sirA::km$		
SirAH1P1	5'- TAT TCT GGA GAT ATT CCT TTG ATC AAC GTT CTT CTT GTT GAT <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u> -3'	PS1
SirAH2P2	5'- TAA CGT CTC CGC ATT ACA CAG GCC ATG GCG GAT TGC CAG GTG <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u> -3'	PS2
Caracterización de la mutante $\Delta sirA::km$		
SirA-F	5'- GCC <u>GGA TCC</u> ATC GCC TGC AGC ATC AGC -3'	<i>BamHI</i>

SirA-R	5'- AGC <u>AAG CTT</u> CAC CGA CAA CTT TAA TGC -3'	<i>HindIII</i>
Construcción de la mutante $\Delta barA::km$		
BarAH1P1	5'- CCA TAA CGG AAC TCC ATG ACC AAC TAC AGC CTG CGC GCA CGC <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u> -3'	PS1
BarAH2P2	5'- CGC CAT CCG GCG AAT ATC AGC CTA ATA TCT TCT TCG CTT CAC <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u> -3'	PS2
Caracterización de la mutante $\Delta barA::km$		
BarAF-T3	5'- TGA <u>CTC GAG</u> CGG TTA TGA TCT GAC GCG TC -3'	<i>XhoI</i>
BarAR-T3	5'- GAA <u>GGA TCC</u> GAG TGA AAA CGT ACG AAT GAC -3'	<i>BamHI</i>
Construcción de la mutante $\Delta csrB::km$		
CsrBH1P1	5'- TTG TAA GAC AAG GTG AAA CAG GCG ATT CTA TCT TCG TCG ACA GGG <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u> -3'	PS1
CsrBH2P2	5'- AAA CCT CAA TGA TGA AAA TCT GGC GCG AAG AAT AAC AAA AAA AAG <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u> -3'	PS2
Construcción de la mutante $\Delta csrC::km$		
CsrCH1P1	5'- GTG AGT TTA CCC CAA AAG AGT AAA GTA ATG CAC ATA GCG AGG <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u> -3'	PS1
CsrCH2P2	5'- ATT CAG TAT AGA ATT GAG GCG GAA TCT AGC AGA AAG CAA GCA <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u> -3'	PS2
Caracterización de la mutante $\Delta csrC$		
CsrC-F	5'- GAC CAT TGC ACT TAT GCG AC -3'	
CsrC-R	5'- AGG CGT TTA CGG TCG CGC -3'	
Construcción de la mutante $\Delta csrA::km$		
CsrAH1P1	5'- GAG ACC CGA CTC TTT TAA TCT TTC AAG GAG CAA AGA ATG CTG ATT <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u> -3'	PS1
CsrAH2P2	5'- CTG CTC ACC CGA AAA GTG AGA CGC GAA AAC CTT AGT AAC TGG <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u> -3'	PS2
Caracterización de la mutante $\Delta csrA::km$		
CsrA-R	5'- <u>GGG AGC TCT</u> CGA ACC TCC GAC CGC TC -3'	<i>SacI</i>
CsrA-B-Fw2	5'- GCG <u>GGG ATC CGG</u> ACA TGG CGC AAG CC -3'	<i>BamHI</i>
Construcción de la mutante $\Delta himA::km$		
IHFAH1P1	5'- CAT TGA GGG ATT GAA AAT ATG GCG CTT ACA AAA GCT GAA ATG <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u> -3'	PS1
IHFAH2P2	5'- TGT TAT GCC TGG ATC TGA TTA CTC TTC TTT GGG CGA AGC GTT <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u> -3'	PS2
Construcción de la mutante $\Delta himD::km$		
IHFBH1P1	5'- TAA GGA ACC GGA GGA ATC ATG ACC AAG TCA GAA TTG ATT GAA <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u> -3'	PS1
IHFDH2P2	5'- CAA GTT TTG CGT TAA AAC TTA ACC GTA AAT ATT GGC GCG ATC <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u> -3'	PS2
Construcción de la mutante $\Delta uvrY::km$		

UvrYH1P1	5'- ATT TCT GGA GAT ATT CCT TTG ATC AAC GTT CTA CTT GTT GAT <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u> -3'	PS1
UvrYH2P2	5'- TAA TGT CTC CGC ATT ACA CAG ACC ATG GCG AAT TGC CAG GTG <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u> -3'	PS2
Caracterización de la mutante ΔuvrY::km		
UvrYF-T3	5'- GGT <u>AAG CTT</u> TTG GTG ACG GGC GTG ACC -3'	HindIII
UvrYR-T3	5'- ATA <u>GGG ATC CGT ACC ACC AGC ATC GTA CAT G</u> -3'	BamHI
Etiquetado del gen <i>ssrB</i> con epítipo FLAG		
SsrBFLAG-F	5'- GAG TTA CTT AAC TGT GCC CGA AGA ATG AGG TTA ATA GAG TAT <u>GAC TAC AAA GAC CAT GAC GG</u> -3'	FLAG
SsrBFLAG-R	5'- ATC AAA ATA TGA CCA ATG CTT AAT ACC ATC GGA CGC CCC TGG <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u> -3'	FLAG
Caracterización de las mutantes ΔsirA::km, ΔbarA::km, ΔuvrY::km, ΔcsrB::km, ΔcsrC::km, ΔcsrA::km, ΔhimA::km, ΔhimD::km y caracterización de la cepa <i>ssrB-FLAG</i>		
K1	5'- CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT -3'	
K2	5'- CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC -3'	
Ensayos de retardamiento		Gen blanco
SigD-BH1F	5'- TCCCGACAGGATCCTTTTACCC -3'	<i>sigD</i>
SigD-H3R	5'- CGTTGTATAAGCTTTTTTGTAG -3'	<i>sigD</i>
HilD-F	5'- AATGGATCCTCACAGCCGTTTCAGTGAG -3'	<i>hilD</i>
HilD-R	5'- CTGAAGGTTATCTGCGGCAGGACGC -3'	<i>hilD</i>
HilA-1F	5'- ATCGGATCCCTCTGAGAACTATTTGC -3'	<i>hilA</i>
HilA-2R	5'- GACAAGCTTTTCTGAGCGTAGCAGGG -3'	<i>hilA</i>
CsrC-F	5'- CTTCGGATCCGCAATCGGAAGGTAATGG -3'	<i>csrC</i>
CsrC-R	5'- CCTGAAGCTTCGCCTCCTGGCGCTCC -3'	<i>csrC</i>
CsrB-F	5'- TTCAAGCTTCGACTCCCTGTGACGAAG -3'	<i>csrB</i>
CsrB-R	5'- TAGGCCACCTGGTCACGC -3'	<i>csrB</i>
HilC-F	5'- ACCCCCGGGATGCAGGAGATTATTTTATC -3'	<i>hilC</i>
HilC-R	5'- GGCTGTCGACGGTGATTATTGCTAATGGC -3'	<i>hilC</i>
CsrB-230Rv	5'- AAT <u>GGA TCC</u> CGC AAC TTA ATC CTC TTC TG -3'	<i>csrB-230</i>
CsrB-170Rv	5'- TCT <u>GGA TCC</u> GTC TGT AGG AGA TCG CCA GG -3'	<i>csrB-170</i>
CsrB-114Rv	5'- CTT <u>GGA TCC</u> GTC TAT ATA AAA CAA CTA ATT AAA ATG -3'	<i>csrB-114</i>
SsaBF	5'- GGC TAA <u>GAT CTT</u> CGG CCC TGA TAT CCT G -3'	<i>SsrAB+478A</i>
SsrAB-11aR	5'- CTG TGA CAA GGT ATA TGT AGA C -3'	<i>ssrAB+478A</i>
SsrAB-11bF	5'- TAC TCT TCT TGT ACA ATA TCA GG -3'	<i>ssrAB+478B</i>
SsrAB-11bR	5'- GTC GAT GAC TAC AAT TAC TTT TTA -3'	<i>ssrAB+478B</i>
SsrAB-11cF	5'- ACG ATG TTT TTA CAT CGC CAT C -3'	<i>ssrAB+478C</i>
SsrAB-11cR	5'- CTT GAG ATT GAG CAA ATT CAT AAT -3'	<i>ssrAB+478C</i>

SsrAB-11dF	5'- TTT GCA ACA GGC AAC TGG AG -3'	<i>ssrAB+478D</i>
SsrAB-11dR	5'- GGA TAG AAC GGA TAA ATC CTC -3'	<i>ssrAB+478D</i>
SsrAB-11eF	5'- CAA TGG TTC AGA AAC GGC AGC -3'	<i>ssrAB+478E</i>
SsrBR+478	5'- TTG <u>GTC GAC</u> CGA CAG ATA GAT GCC GG -3'	<i>ssrAB+478E</i>
SirA-FT3	5'- CAT <u>AAG CTT</u> CAA AAA CGA GAG CAA AAT CG -3'	<i>sirA</i>
SirAD54A-R	5'- ATA CCG GGC ATG TTC ATC <u>GCC</u> ATC AGC ACG ACG TC -3'	<i>sirA</i>
qRT-PCR		
HilD-RT-F	5'- GCAGGTAGTTAACGTGACGC -3'	
HilD-RT-R	5'- TTGCTGCTCGTTTGGGATAAG -3'	
DNAK-RT-F	5'- CGTCAGGCAACCAAAGATGC -3'	
DNAK-RT-R	5'- CGCGATAGTACGGTTGCCG -3'	

La modificación se indica subrayada en la secuencia

Tabla 4. Antibióticos y dosis empleadas en este trabajo

Ampicilina (Amp)	200 µg/ml
Estreptomina (Str)	100 µg/ml
Kanamicina (Km)	20 µg/ml
Ácido Nalidixico (Nal)	15 µg/ml
Tetraciclina (Tet)	10 µg/ml

5. RESULTADOS

5.1. Cascada de regulación formada por los sistemas BarA/SirA y Csr, que induce la expresión de los genes SPI-1 y SPI-2 a través de HilD.

5.1.1. BarA/SirA regula a los genes de SPI-1 y SPI-2 a través de HilD

Para determinar de qué manera BarA/SirA y HilD inducen la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, previamente habíamos analizado la expresión de *hilA* y de SsrB en mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta hilD$ que contienen plásmidos que expresan a HilD o a SirA. La expresión de *hilA* fue monitoreada con una fusión transcripcional de la región reguladora de *hilA* al gen reportero *cat* (*hilA-cat*), mientras que la expresión de SsrB fue monitoreada mediante un experimento de Western-blot, usando cepas de $\Delta sirA$ y $\Delta hilD$ que expresan a SsrB etiquetado con un epítipo de FLAG y detectando la expresión con anticuerpos anti-FLAG. Los plásmidos que expresan a SirA fueron capaces de restaurar la expresión de *hilA* y SsrB-FLAG únicamente en la mutante en $\Delta sirA$, mientras que los plásmidos que expresan a HilD restauraron la expresión de *hilA* y SsrB-FLAG en ambas mutantes (Figuras 7 A y B, Martínez, LC., 2007). Posteriormente analizamos también la expresión de HilA mediante Western blot en mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta hilD$ que expresan a HilA etiquetada con el epítipo de FLAG y empleando los mismos plásmidos que se usaron para analizar la expresión de SsrB y que expresan a SirA (pBADSirA1) o a HilD (pBADHilD1). En acuerdo con lo observado con el análisis de la fusión transcripcional *hilA-cat*, la expresión de HilA-FLAG fue restaurada en la mutante *hilD* únicamente con el plásmido que expresa a HilD a niveles semejantes a los de la cepa silvestre, mientras que dicha expresión fue restaurada en la mutante $\Delta sirA$ tanto con el plásmido que expresa a SirA como con el que expresa a HilD (Figura 7C). Además, estos resultados también concuerdan con lo observado al analizar el perfil de secreción de proteínas de SPI-1. La cepa silvestre presentó el perfil típico de proteínas secretadas de *S. Typhimurium*, que corresponden a las proteínas SipA, SipB, SipC y SipD, codificadas en SPI-1, cuya secreción es dependiente del SST3 también codificado en SPI-1, así como la proteína del flagelo FliC, cuya expresión y secreción no depende de SPI-1 o SPI-2 (Fig. 7D). Al analizar este perfil en las mutantes $\Delta hilD$ y $\Delta sirA$, la secreción de proteínas se afecta, pero

este perfil es restaurado en la mutante *sirA* que contiene el plásmido que expresa a SirA o el plásmido que expresa a HilD. En contraste, en la cepa mutante Δ *hilD*, sólo el plásmido que expresa a HilD es capaz de restaurar el perfil de secreción afectado (Figura 7D).

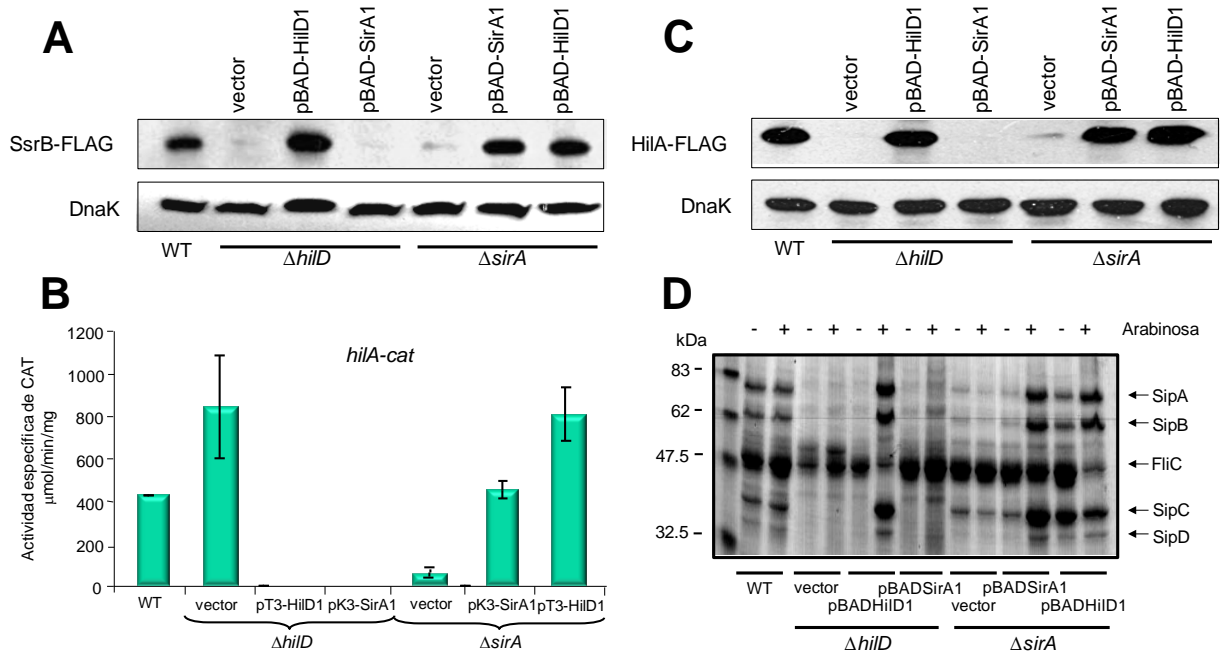


Figura 7. SirA induce la expresión de SsrB y *hilA* a través de HilD. Detección mediante Western blot de las proteínas SsrB y HilA (A y C, respectivamente), análisis de la expresión de la fusión *hilA-cat* (B) y análisis del perfil de secreción de proteínas de SPI-1 (D), en la cepa silvestre y en cepas mutantes Δ *hilD* y Δ *sirA* que contienen o no, plásmidos que expresan a SirA o HilD. Las cepas se crecieron en LB durante 5 horas, para analizar la expresión de *hilA* (SPI-1), 10 horas para analizar la expresión de SsrB (SPI-2) y 9 horas para analizar el perfil de secreción proteica. La expresión de HilD y SirA a partir de los plásmidos pBAD-HilD1 y pBAD-SirA1 respectivamente, fue inducida al agregar 0.1% de L-arabinosa al medio al inicio de los cultivos bacterianos (A, C y D).

Estos resultados confirman que HilD no requiere de SirA para inducir la expresión de HilA y SsrB, mientras que SirA sí requiere de HilD para inducir dicha expresión, lo cual sugiere que SirA actúa en cascada, regulando positivamente a HilD, el cual a su vez regularía a *hilA* y *ssrAB*. En apoyo a esta noción, la presencia del plásmido pT3-HilD1, que expresa a HilD, pero no el plásmido pK3-SirA1, que expresa a SirA, activó la expresión de las fusiones transcripcionales *hilA-cat*, *hilC-cat* y *rtsA-cat* en ausencia de cualquier otro regulador específico de *Salmonella*, ya que esto fue determinado en una cepa mutante Δ *uvrY* de *E. coli* carente de UvrY, el ortólogo de SirA en *E. coli* (Figuras 8 A,

B y C). En contraste, la expresión de una fusión *csrB-cat* en este mismo fondo genético fue activada en presencia del plásmido pK3-SirA1, pero no en presencia del plásmido pT3-HilD1 (Figura 8D). Estos resultados concuerdan con estudios en los que se reporta que HilD activa directamente la expresión de *hilA*, *hilC* y *rtsA* (Schechter *et al.*, 1999; Schechter y Lee, 2001; Ellermeier *et al.*, 2005) y que SirA controla directamente la expresión de *csrB* (Teplitski *et al.*, 2003; Teplitski *et al.*, 2006).

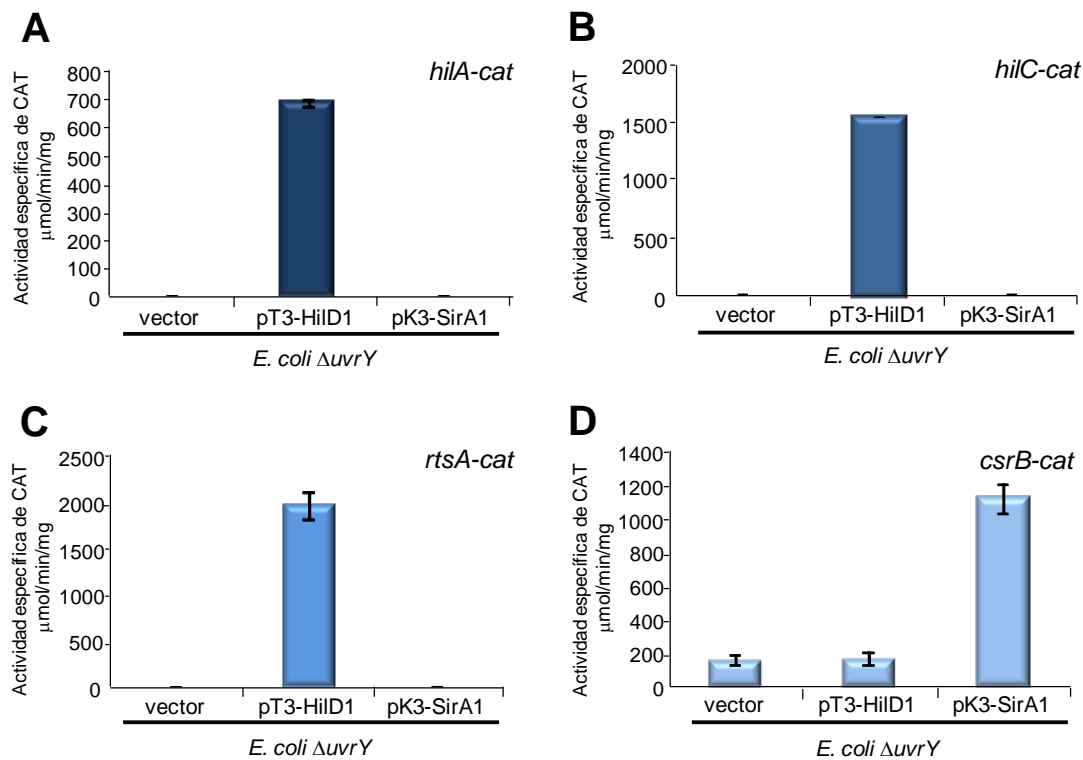


Figura 8. SirA induce la expresión de *csrB*, pero no de *hilA*, *hilC* y *rtsA*, en ausencia de HilD. La expresión de las fusiones transcripcionales *hilA-cat* (A), *hilC-cat* (B), *rtsA-cat* (C) y *csrB-cat* (D), fue determinada en la cepa *E. coli* Δ *uvrY*, en presencia de plásmidos que expresan a HilD (pT3-HilD1) o SirA (pK3-SirA1). La actividad específica de CAT fue determinada a partir de muestras de cultivos crecidos en LB durante 5 horas. Los datos son el promedio de 3 experimentos independientes hechos por duplicado. Las barras representan la desviación estándar.

Los resultados previamente descritos sugieren que el sistema BarA/SirA controla la expresión de *hilD*. Para determinar esto, analizamos la expresión de *hilD* mediante ensayos de qRT-PCR, en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en sus derivadas mutantes Δ *sirA* y Δ *barA*. Como un control, la expresión de *hilD* también se analizó en la mutante Δ *hilD*, ya que se sabe que HilD se autoregula positivamente (Olekhovich y Kadner, 2002; Ellermeier *et al.*, 2005).

La expresión de *hilD* disminuyó de manera similar en las mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta barA$ y fue aún mayor en la mutante *hilD* (Figura 9A), indicando que BarA/SirA controla positivamente a *hilD* y confirmando la auto-regulación de HilD. El mismo efecto se observó cuando analizamos la expresión de *hilD* empleando una fusión transcripcional *hilD-cat* en las cepas mutantes $\Delta sirA$, $\Delta barA$ y $\Delta hilD$ (Figura 9B, Martínez LC., 2007).

Estos resultados, junto con aquellos reportados en otros estudios, indican que BarA/SirA controla positivamente la expresión de *hilD*.

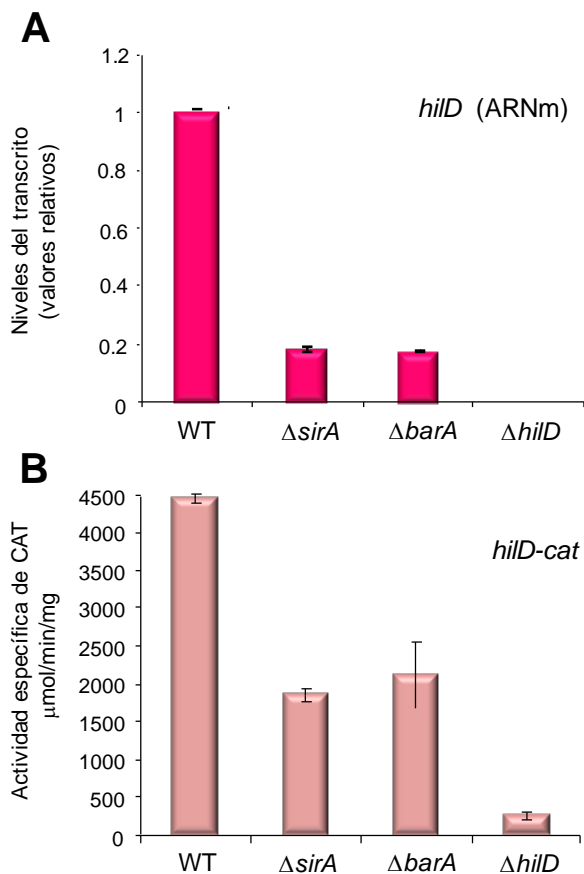


Figura 9. SirA y BarA, regulan positivamente la expresión de *hilD*. La expresión de *hilD* se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium* y las mutantes $\Delta sirA$, $\Delta barA$ y $\Delta hilD$, cuantificando el ARNm de *hilD* por qRT-PCR (A) o monitoreando la expresión de la fusión transcripcional *hilD-cat* (B). Las muestras fueron tomadas de cultivos crecidos durante 5 horas en medio LB. Los datos de la actividad específica de CAT representan el promedio de 3 experimentos hechos por duplicado. *dnaK* fue usado como control interno para normalizar los resultados obtenidos para la expresión de *hilD* por medio del qRT-PCR. Los datos indican la expresión relativa de *hilD*, con respecto a su expresión en la cepa silvestre y son el promedio de dos experimentos hechos por triplicado. Las barras representan la desviación estándar.

5.1.2. *SirA* se une a las regiones reguladoras de *csrB* y *csrC* pero no a la de *hilD*

Los resultados descritos arriba apoyan la idea de que *SirA* actúa a través de *HilD* para controlar indirectamente la expresión de *hilA* y *ssrAB*. Estudios previos habían reportado que *SirA* podría actuar junto con *HilD* o a través de *HilD* para controlar la expresión de *hilA* y la regulación de SPI-1 (Ellermeier *et al.*, 2005). Además, se ha reportado que *SirA* regula la expresión de los genes que codifican a *CsrB* y *CsrC*, moléculas de ARN no codificante que a su vez están involucrados en la expresión de los genes de SPI-1 y la invasión de *Salmonella*, pero su mecanismo de acción no se ha definido con precisión a la fecha. (Altier *et al.*, 2000a; Teplitski *et al.*, 2003; Fortune *et al.*, 2006; Teplitski *et al.*, 2006).

Por otro lado, otro estudio mostró que *SirA* se une a las regiones reguladoras de *hilA* y *csrB*, pero no a la de *hilD* y *csrC* (Teplitski *et al.*, 2003; Teplitski *et al.*, 2006).

Con el fin de esclarecer el mecanismo por el cual *SirA* controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, analizamos la interacción de esta proteína con las regiones reguladoras de los genes que se encuentran regulados por ella. *SirA* fue purificada a partir del plásmido pMAL-*SirA*, que expresa a *SirA* fusionada al extremo carboxilo de la proteína de unión a maltosa (MBP). Esta proteína fue capaz de restaurar el perfil de proteínas secretadas afectado en una mutante $\Delta sirA$, lo que demostró su funcionalidad. Además de esto, mediante experimentos de retardamiento en gel (Electrophoretic Mobility Shift Assays, EMSAs) demostramos que la proteína MBP-*SirA*, independientemente de su estado de fosforilación, se une a un fragmento correspondiente a la región reguladora de *csrB* marcado radioactivamente, a partir de una concentración de 1.5 μ M (Figuras 10 y 14F). Estos resultados indican que la fosforilación de MBP-*SirA* no es requerida para su unión al DNA *in vitro*, lo cual es consistente con resultados previos que han mostrado que la fosforilación de una proteína *SirA*-His6x sólo aumenta la afinidad por el DNA aproximadamente dos veces (Teplitski *et al.*, 2003). En contraste, la proteína MBP-*SirA* no fue capaz de unirse a un fragmento de la región reguladora de *sigD*, codificado fuera de las islas de patogenicidad, el cual fue empleado como control negativo por ser un gen que no es regulado directamente por *SirA*, incluso a concentraciones de 3 μ M (Figura 10).

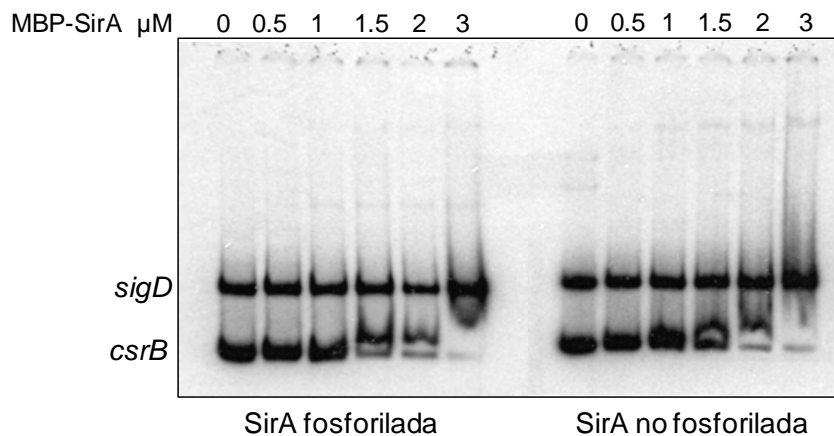


Figura 10. SirA se une a *csrB*. Un fragmento marcado con ^{32}P en el extremo 5', que contiene la región reguladora de *csrB*, fue empleado para realizar los EMSAs con concentraciones crecientes de la proteína MBP-SirA fosforilada o no fosforilada. La región reguladora de *sigD*, un gen no regulado directamente por SirA, fue usada como control negativo.

La fosforilación de SirA *in vivo* parece ser crítica para su función, porque cuando el residuo Asp54, el cual se ha predicho que es el sitio de fosforilación para SirA, fue sustituido por un residuo de alanina, o en ausencia de la proteína cinasa reguladora BarA, la expresión de *csrB* no se induce (Figura 11). Por lo tanto, parece que las condiciones usadas *in vitro* para analizar la unión de MBP-SirA, o la fusión de SirA con MBP o con la etiqueta de histidinas, dan por resultado la generación de una proteína SirA que se une específicamente a sus ADNs blanco sin importar su estado de fosforilación.

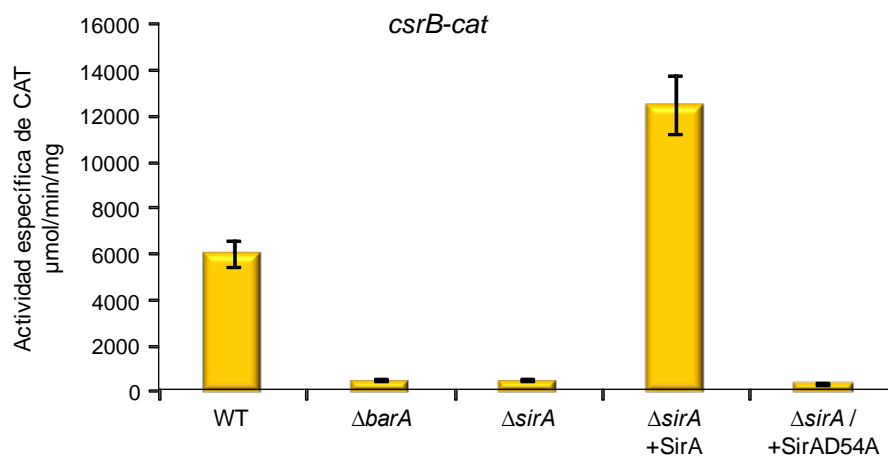


Figura 11. La fosforilación de SirA es necesaria para inducir la expresión de *csrB* *in vivo*. La expresión de la fusión transcripcional *csrB-cat* se determinó en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* así como en las mutantes $\Delta barA$ y $\Delta sirA$. Ésta última se complementó con un plásmido que expresa a la proteína SirA silvestre o con un plásmido que expresa a la proteína SirA mutada en el residuo D54, que es el sitio predicho de fosforilación de SirA. La actividad específica de CAT se determinó a partir de muestras de cultivos crecidos durante 5 horas en el medio LB. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos hechos por duplicado. Las barras representan las desviaciones estándar.

Para corroborar la especificidad de la unión de MBP-SirA al ADN, realizamos ensayos de EMSA competitivos en los que la unión de SirA hacia un fragmento de *csrB* marcado radioactivamente, se puso a competir al agregar en exceso otro fragmento de *csrB* que no está marcado radioactivamente. Como se muestra en la figura 12, el fragmento de *csrB* no marcado es capaz de deshacer el complejo que MBP-SirA había formado previamente con el fragmento de *csrB* marcado. En contraste, cuando la competencia se hizo agregando un exceso de un fragmento de *sigD* no marcado, la unión de MBP-SirA hacia el fragmento de *csrB* marcado, no se deshace (Figura 12). Por lo tanto, sólo el fragmento *csrB* fue capaz de competir y desplazar la interacción de MBP-SirA con el fragmento marcado de *csrB*.

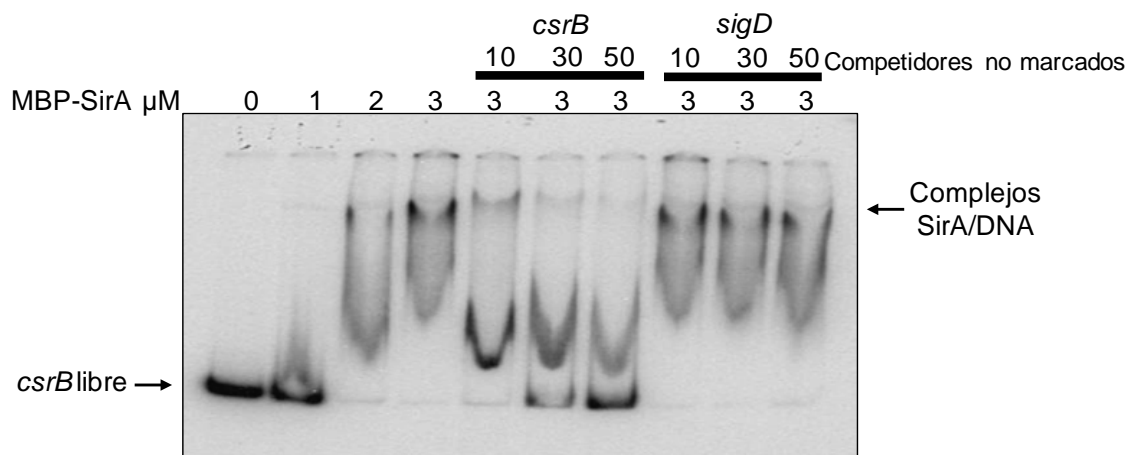


Figura 12. SirA se une específicamente a *csrB*. EMSAs competitivos. El fragmento que contiene la región reguladora de *csrB*, marcado con ^{32}P , fue mezclado con 1, 2 o 3 μM de la proteína MBP-SirA fosforilada en presencia o ausencia de 10, 30 o 50 veces un exceso del competidor específico (*csrB*) o no específico (*sigD*) no marcados. Los complejos DNA-proteína se resolvieron en geles de acrilamida al 6%.

Posteriormente realizamos los EMSAs con la proteína MBP-SirA y fragmentos que contienen las regiones reguladoras de *hilD*, *hilA*, *hilC*, *ssrAB* y *csrC*, marcados radioactivamente. Los fragmentos de ADN usados para estos EMSAs fueron aquellos empleados para la construcción de las fusiones transcripcionales que mostraron regulación por SirA. Como se muestra en la figura 13 (A, B, C y D), los fragmentos de las regiones de *hilD*, *hilA*, *hilC*, *ssrAB* y *sigD* no fueron retardados por la proteína MBP-SirA hasta una concentración de 3 μM . Se obtuvieron resultados similares cuando se empleó una proteína MBP-SirA no fosforilada (Figura 14A, B, C, y D). A mayores concentraciones ($\geq 5 \mu\text{M}$), tanto la proteína fosforilada como la no fosforilada, se unieron a todos los

fragmentos, incluyendo al control negativo *sigD*, lo que sugiere que MBP-SirA se une de manera inespecífica a estas concentraciones (dato no mostrado).

En contraste, MBP-SirA fue capaz de unirse al fragmento que contiene la región reguladora de *csrC*, desde una concentración de 2 μM (Figuras 13E y 14E), hecho que sólo se había reportado previamente para *csrB* (Fortune *et al.*, 2006). La especificidad de esta unión se comprobó mediante un EMSA competitivo, tal como se describió para *csrB*. En este caso, únicamente el exceso de *csrC* no marcado fue capaz de deshacer la interacción de MBP-SirA con el fragmento de *csrC* marcado radioactivamente (Figura 13F), confirmando la unión específica de MBP-SirA con *csrC*. La regulación de *csrB* y *csrC* mediada por SirA fue confirmada analizando la expresión de las fusiones transcripcionales *csrB-cat* y *csrC-cat* en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y su derivada mutante ΔsirA (Figura 15).

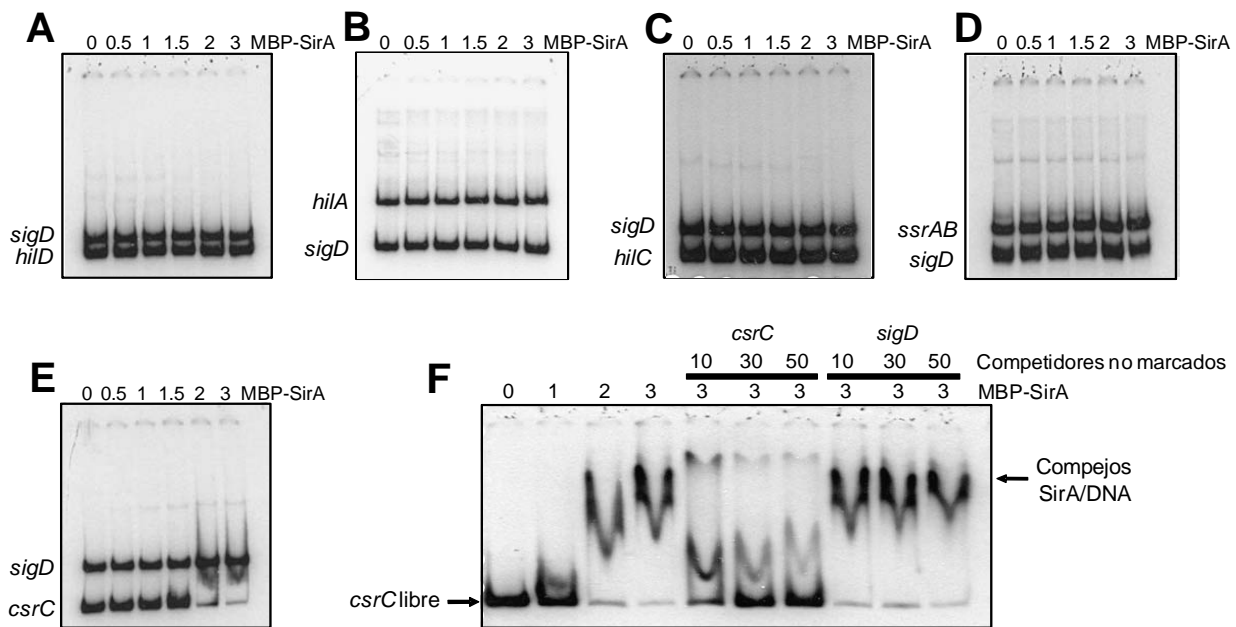


Figura 13. SirA fosforilada se une específicamente a *csrC*, pero no a *hilD*, *hilA*, *hilC* o *ssrAB*. Fragmentos marcados con ^{32}P , que contienen la región reguladora de *hilD* (A), *hilA* (B), *hilC* (C), *ssrAB* (D) y *csrC* (E), fueron incubados con concentraciones crecientes de la proteína MBP-SirA fosforilada (0.5, 1, 1.5, 2 y 3 μM). Estos fragmentos corresponden a aquellos contenidos en las fusiones transcripcionales *hilD-cat*, *hilA-cat*, *hilC-cat*, *ssrAB-cat* y *csrC-cat* que fueron reguladas por SirA. Como control negativo, se empleó un fragmento que contiene la región reguladora de *sigD*, un gen cuya expresión no es controlada directamente por SirA. El pegado de SirA sobre *csrC* fue analizado también mediante EMSA competitivo (F), en el que el fragmento marcado de la región reguladora de *csrC*, fue mezclado con 1, 2 o 3 μM de la proteína MBP-SirA fosforilada en ausencia o presencia de 10, 30 o 50 veces un exceso de competidor específico (*csrB*) o no específico (*sigD*), no marcados. Los complejos DNA-proteína fueron visualizados en gels de acrilamida al 6%.

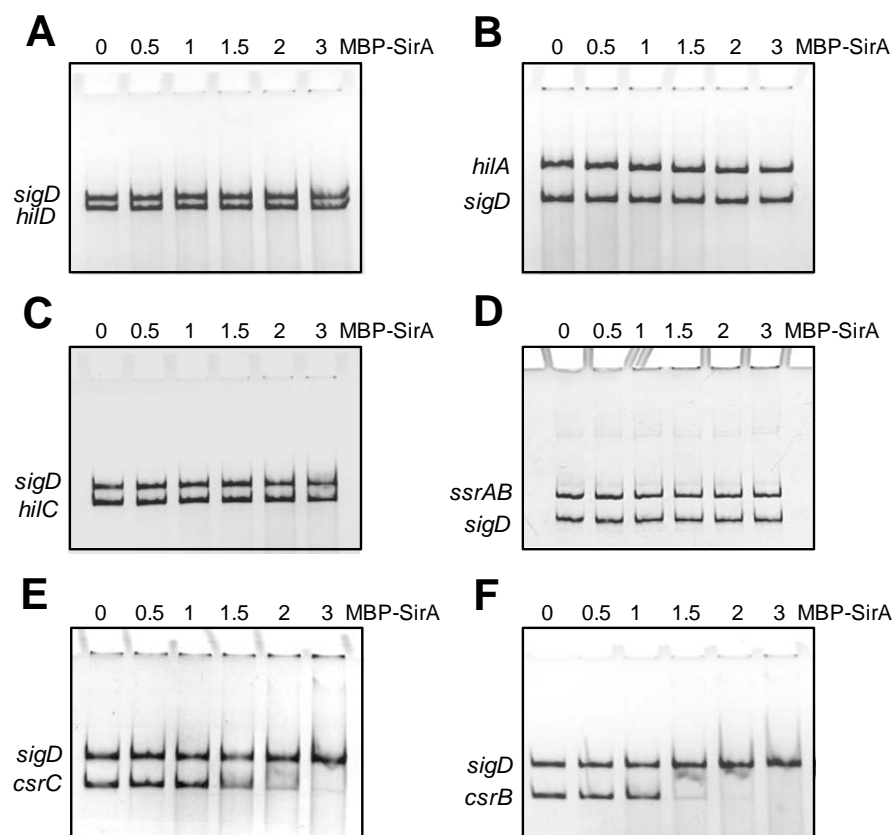


Figura 14. SirA no fosforilada se une a *csrB* y *csrC*, pero no a *hilD*, *hilA*, *hilC* o *ssrAB*. Fragmentos que contienen la región reguladora de *hilD* (A), *hilA* (B), *hilC* (C), *ssrAB* (D), *csrC* (E) y *csrB* (F), fueron incubados con concentraciones crecientes de la proteína MBP-SirA no fosforilada (0.5, 1, 1.5, 2 y 3 μ M). Estos fragmentos corresponden a aquellos contenidos en las fusiones transcripcionales *hilD-cat*, *hilA-cat*, *hilC-cat*, *ssrAB-cat* y *csrC-cat* que fueron reguladas por SirA. Como control negativo, se empleó un fragmento que contiene la región reguladora de *sigD*, un gen cuya expresión no es controlada directamente por SirA.

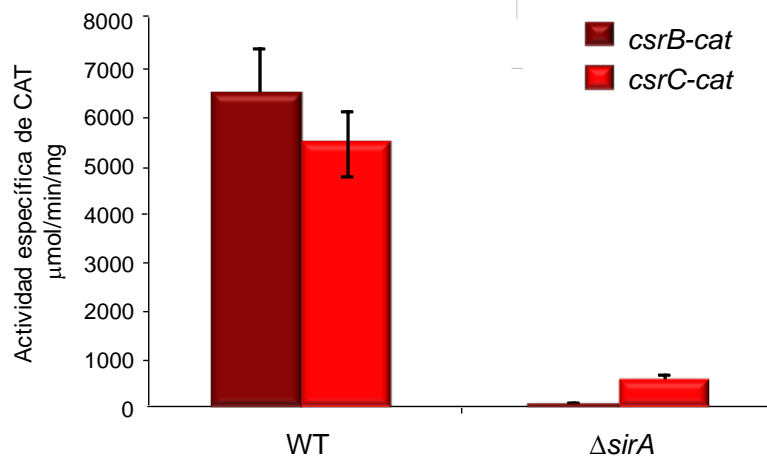


Figura 15. SirA regula positivamente la expresión de *csrB* y *csrC*. La expresión de las fusiones transcripcionales *csrB-cat* y *csrC-cat* fue analizada en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y su derivada mutante $\Delta sirA$. La actividad específica de CAT fue determinada a partir de muestras de cultivos crecidos durante 5 horas en medio LB. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes. Las barras representan las desviaciones estándar.

La ausencia de unión de SirA hacia las regiones reguladoras de *hilA* y *ssrAB* es consistente con las evidencias genéticas que indican que el sistema BarA/SirA regula la expresión de *ssrAB* y *hilA* de manera indirecta, a través de HilD. Por otro lado, la unión específica de SirA hacia las regiones reguladoras de *csrB* y *csrC* y no a la de *hilD* podría sugerir que la regulación de *hilD* mediada por SirA se da a través del sistema CsrB/C.

5.1.3. SirA controla la expresión de HilD a través de las moléculas de ARN CsrB y CsrC

Como ya se ha mencionado, en otras bacterias los ortólogos de BarA/SirA controlan la expresión génica al inducir directamente la expresión de *csrB* y *csrC*, que codifican para dos moléculas de ARN no traducido, CsrB y CsrC respectivamente (Babitzke y Romeo, 2007; Lapouge *et al.*, 2008; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008).

Para determinar si BarA/SirA regula la expresión de *hilD* y así a los genes de SPI-1 y SPI-2, a través de CsrB y CsrC, construimos las mutantes sencillas $\Delta csrB$ y $\Delta csrC$, así como la doble mutante $\Delta csrB \Delta csrC$. Posteriormente analizamos la expresión de las fusiones transcripcionales *hilD-cat* (SPI-1), *hilA-cat* (SPI-2), *ssrAB-cat* (SPI-2) y *ssaG-cat* (SPI-2) en estas mutantes y la comparamos con su expresión en la cepa silvestre de *S.*

Typhimurium y en la mutante $\Delta sirA$. Adicionalmente, la expresión de *hilD* en estas cepas se analizó mediante qRT-PCR.

La expresión de *hilD* no se afectó en las mutantes sencillas $\Delta csrB$ y $\Delta csrC$; sin embargo, su expresión en la doble mutante $\Delta csrB \Delta csrC$ disminuyó al mismo nivel que lo hizo en la mutante $\Delta sirA$, en comparación con los niveles observados en la cepa silvestre (Figuras 16 A y B). Como era de esperarse, la expresión de *hilA*, *ssrAB* y *ssaG* también se redujo en la doble mutante $\Delta csrB \Delta csrC$ y en la mutante $\Delta sirA$ de manera similar, pero no en las mutantes sencillas $\Delta csrB$ y $\Delta csrC$ (Figuras 16 C, D y E).

Por otro lado, la secreción de proteínas efectoras de SPI-1 (SipA, SipB, SipC y SipD) (Figura 16F, superior), así como la expresión de la proteína efectora de SPI-2, SseB (Figura 16F, inferior), fueron considerablemente reducidas en la mutante $\Delta sirA$, y como era de esperarse, en la doble mutante $\Delta csrB \Delta csrC$, pero no en las mutantes sencillas $\Delta csrB$ y $\Delta csrC$. En apoyo a estos resultados, un estudio previo reportó que la expresión de *hilA* y *sipC* (un gen de SPI-1), disminuyó en una doble mutante $\Delta csrB \Delta csrC$, mientras que no se afectó en mutantes sencillas $\Delta csrB$ y $\Delta csrC$ (Fortune *et al.*, 2006). Se ha demostrado que la ausencia de CsrB causa un aumento compensatorio en los niveles de CsrC y viceversa (Weilbacher *et al.*, 2003; Fortune *et al.*, 2006), lo cual explica el hecho de que la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 sólo se afecte en la doble mutante, pero no en las mutantes sencillas.

En conjunto, estos resultados indican que CsrB y CsrC regulan positivamente la expresión de *hilD* y así a los genes de SPI-1 y SPI-2, sugiriendo además que SirA podría regular la expresión de *hilD* a través de estas moléculas de ARN.

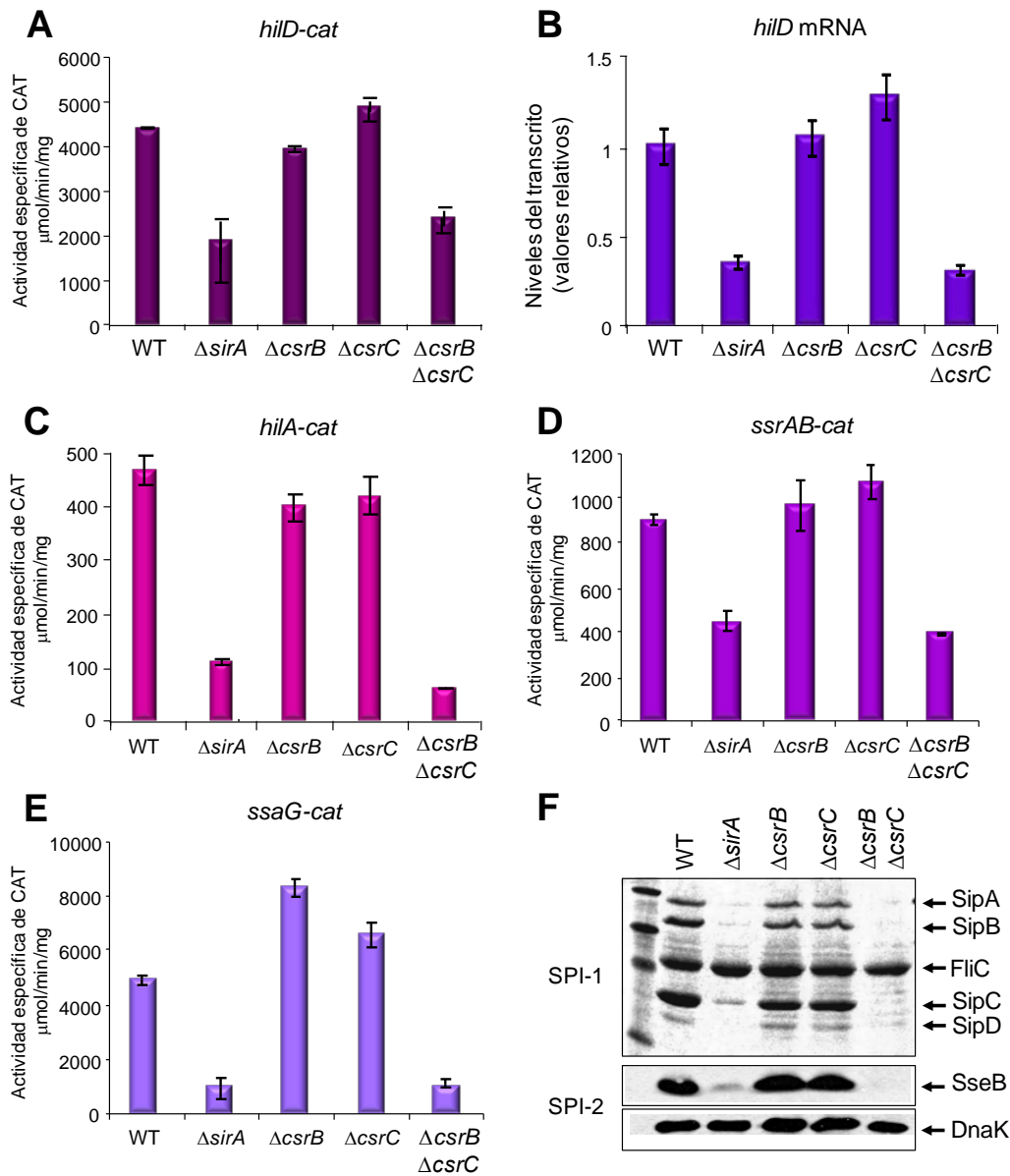


Figura 16. SirA y CsrB/C se requieren para inducir la expresión de *hilD* y por lo tanto de los genes de SPI-1 y SPI-2. La expresión de las fusiones transcripcionales *hilD-cat* (A), *hilA-cat* (C), *ssrAB-cat* (D) y *ssaG-cat* (E), fue determinada en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y sus derivadas mutantes Δ *sirA*, Δ *csrB*, Δ *csrC* and Δ *csrB* Δ *csrC*. La actividad específica de CAT fue determinada a partir de muestras de cultivos crecidos durante 5 horas (para *hilD* y *hilA*) o 10 horas (para *ssrAB* y *ssaG*) en medio LB. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes. Las barras representan las desviaciones estándar. El ARNm de *hilD* fue cuantificado mediante q-RT-PCR (B) usando ARN total de muestras de los mismos cultivos mencionados. El sobrenadante y las pastillas celulares de muestras de cultivos de las mismas cepas crecidas durante 9 horas a 37°C, fueron empleados para analizar la secreción de las proteínas SipA, SipB, SipC y SipD (F, superior) codificadas en SPI-1 y la expresión de SseB, el efector de SPI-2 (F, inferior), respectivamente. FliC es una proteína flagelar cuya secreción es independiente de SPI-1. Los niveles de expresión de la proteína DnaK fueron determinados usando un anticuerpo monoclonal anti-DnaK y fueron empleados como control de carga en el Western blot.

Con el fin de investigar si SirA actúa a través de CsrB/C para regular la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, analizamos la expresión de las fusiones transcripcionales *hilD-cat*, *hilA-cat* y *ssaG-cat* en las mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta hilD$ en presencia del vector pMPM-K3 (vector vacío) o del plásmido pK3-CsrB1 que expresa a CsrB a partir de un promotor constitutivo. La expresión de *hilD*, *hilA* y *ssaG* se restauró en la mutante $\Delta sirA$, pero no en la mutante $\Delta hilD$, en presencia del plásmido pK3-CsrB1 (Figura 17A, B y C).

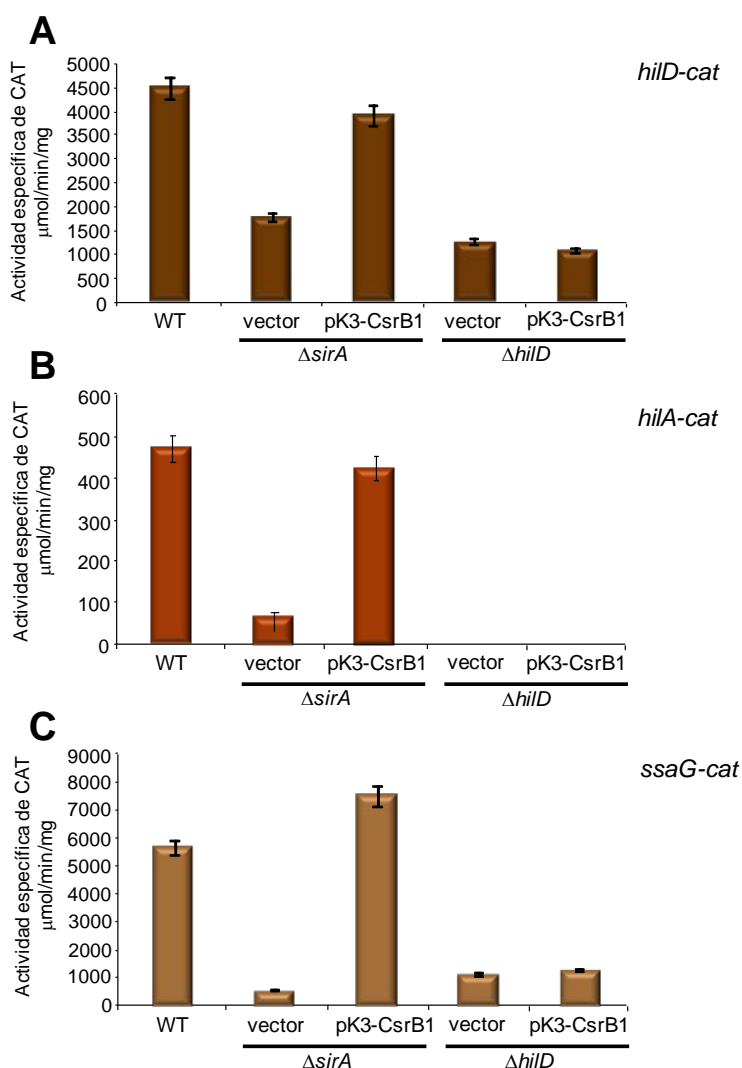


Figura 17. La presencia de CsrB restaura la expresión de *hilD*, *hilA* y *ssaG* en ausencia de SirA pero no en ausencia de HilD. La expresión de las fusiones transcripcionales *hilD-cat* (A) *hilA-cat* (B) and *ssaG-cat* (C), fue determinada en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y las mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta hilD$ que contienen o no, un plásmido que expresa a CsrB (pK3-CsrB1). La actividad específica de CAT fue determinada de muestras de cultivos crecidos durante 5 horas (para *hilD* y *hilA*) o 10 horas (para *ssaG*) en LB. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes. Las barras representan las desviaciones estándar.

Por otro lado, analizamos el perfil de las proteínas secretadas en una triple mutante $\Delta sirA \Delta csrB \Delta csrC$, que contiene un plásmido que expresa a SirA o a HilD, o el vector pBAD. Como se muestra en el panel superior de la figura 18, únicamente el plásmido que expresa HilD, pero no el plásmido que expresa SirA, restauró el perfil de secreción en la mutante $\Delta sirA \Delta csrB \Delta csrC$, indicando que SirA requiere a CsrB y CsrC para inducir la expresión de los genes de SPI-1 y que HilD actúa debajo de SirA y CsrB/C en la cascada de regulación de SPI-1. Además, el plásmido que expresa HilD, pero no el plásmido que expresa SirA, fue capaz de restaurar la expresión de la proteína efectora de SPI-2, SseB, en esta triple mutante $\Delta sirA \Delta csrB \Delta csrC$ (Figura 18, inferior).

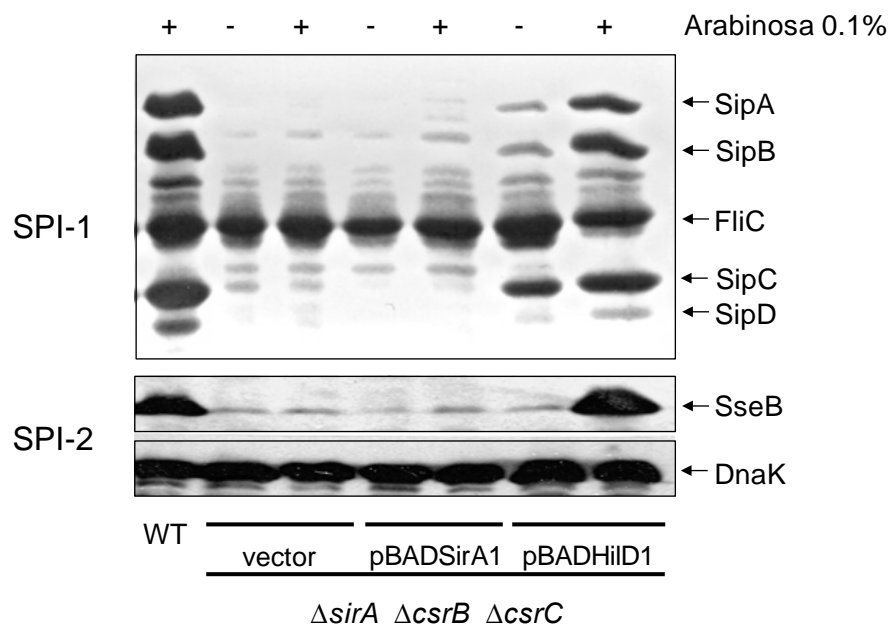


Figura 18. SirA, pero no HilD, requiere la presencia de CsrB/C para inducir la secreción de proteínas de SPI-1 y la expresión del efector SseB codificado en SPI-2. La secreción de proteínas de SPI-1 (superior) y la expresión de SseB (inferior) fue analizada en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y la triple mutante $\Delta sirA \Delta csrB \Delta csrC$, que contienen plásmidos que expresan a SirA (pBADSirA) o HilD (pBADHilD) bajo un promotor inducible por arabinosa, o al vector pBAD. Las cepas se crecieron en LB durante 9 horas y la expresión de SirA y HilD se indujo agregando 0.1% de L-arabinosa al medio de cultivo desde que éstos alcanzaron una DO_{600} de 0.6.

En conjunto, estos resultados sustentan el modelo en el cual SirA regula indirectamente la expresión de *hilD*, y por tanto la de los genes de SPI-1 y SPI-2, al activar directamente la transcripción de *csrB* y *csrC*.

5.1.4. CsrA reprime la expresión de *HilD* al unirse al transcrito líder de *hilD*

Los ortólogos de CsrB y CsrC inducen la expresión génica al contrarrestar la represión post-transcripcional que ejerce CsrA (Babitzke y Romeo, 2007; Timmermans *et al.*, 2010), una proteína que se une a secuencias que se superponen a los sitios Shine-Dalgarno de sus ARNm blancos, lo cual evita su traducción (Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008; Romeo, 1998; Timmermans y Van Melderen, 2010). CsrB y CsrC tienen varios sitios de unión para CsrA; así, al expresarse, se unen a esta proteína y la sequestran, permitiendo la traducción de los genes regulados por CsrA (Babitzke and Romeo, 2007; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008; Romeo, 1998). Reportes previos han involucrado a CsrA en la expresión de los genes de SPI-1 (Altier *et al.*, 2000b; Fortune *et al.*, 2006), sin embargo, no se han definido sus genes blanco directos.

Para definir mejor el papel de CsrA en la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, analizamos primero la expresión de estos genes cuando CsrA es sobre-expresada. Como CsrB y CsrC antagonizan la actividad de CsrA, se esperaba que los fenotipos asociados con la sobre-expresión de CsrA fueran parecidos a los observados en una doble mutante $\Delta csrB \Delta csrC$. La expresión de las fusiones *hilD-cat*, *hilA-cat*, *ssrAB-cat*, así como la expresión de *sirA-cat*, *csrB-cat* y *csrC-cat*, fue analizada en la cepa silvestre de *Salmonella* que contiene el plásmido pMPM-K3 (vector vacío) o el plásmido pK3-CsrA1 que sobre-expresa a CsrA. Adicionalmente, los niveles del transcrito de *hilD* fueron determinados por qRT-PCR y la expresión de las proteínas etiquetadas HilA-FLAG y SsrB-FLAG fue determinada por Western blot en los mismos fondos genéticos. La sobre-expresión de CsrA disminuyó drásticamente la expresión de la *hilD* y, como podría esperarse, también disminuyó la expresión de *hilA* y *ssrAB* (Figuras 19 A, B, C y D). En contraste, la expresión de *sirA*, *csrB* y *csrC* no se modificó (Figuras 19 E, F y G). Además, la sobre-expresión de CsrA disminuyó drásticamente la expresión de HilA-FLAG y SsrB-FLAG, así como la secreción de proteínas de SPI-1 en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* (Figuras 19 H e I).

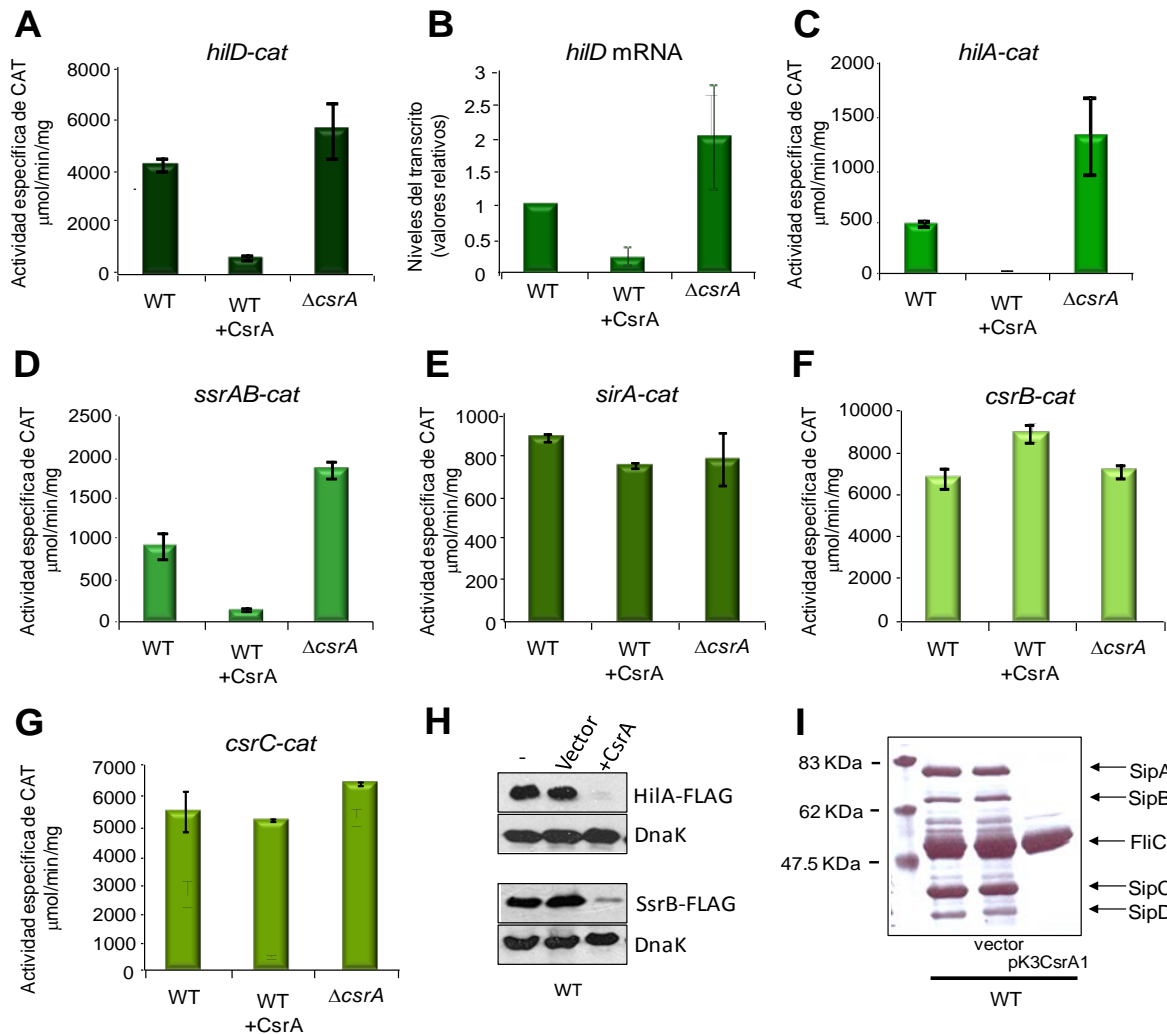


Figura 19. CsrA regula negativamente a *hilD*, *hilA* y *ssrAB*. Expresión de las fusiones *hilD-cat* (A), *hilA-cat* (C), *ssrAB-cat* (D) *sirA-cat* (E), *csrB-cat* (F) y *csrC-cat* (G) en la cepa silvestre de *Salmonella* que contiene o no, el plásmido pT3-CsrA1 que sobre-expresa a CsrA, así como en la mutante *csrA*. La actividad específica de CAT fue determinada de muestras de cultivos crecidos durante 5 horas (para *hilD*, *hilA*, *sirA*, *csrB* y *csrC*) o 10 horas (para *ssrAB*) en LB. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes. Las barras representan las desviaciones estándar. El ARNm de *hilD* fue cuantificado mediante q-RT-PCR (B) usando ARN total de muestras de los mismos cultivos mencionados. La expresión de HiIA-FLAG y SsrB-FLAG en la cepa silvestre que contiene o no el plásmido pT3-CsrA1 fue analizada por Western blot mediante anticuerpos anti-FLAG (H), a partir de muestras tomadas de cultivos crecidos en LB, durante 5 horas para HiIA-FLAG y 10 horas para SsrB-FLAG. Como control de carga, los niveles de expresión de la proteína DnaK fueron determinados usando anticuerpos anti-DnaK (H). El perfil de secreción de proteínas de SPI-1 se analizó en la cepa silvestre que contiene o no el plásmido pT3-CsrA1, a partir de muestras tomadas de cultivos crecidos durante 9 horas en LB (I).

Para confirmar el papel de CsrA, analizamos la expresión de las mismas fusiones transcripcionales *hilD-cat*, *hilA-cat*, *ssrAB-cat*, *sirA-cat*, *csrB-cat* y *csrC-cat*, en una mutante $\Delta csrA$. Nuevamente los niveles del transcrito de *hilD* fueron analizados por qRT-

PCR en esta cepa. De manera consistente con los resultados obtenidos con la sobre-expresión de CsrA, la expresión de *hilD*, *hilA* y *ssrAB* aumentó significativamente en la mutante $\Delta csrA$ (Figuras 19 A, B, C y D), mientras que la expresión de *sirA*, *csrB* y *csrC* no se afectó en esta mutante (Figuras 19 E, F y G). En acuerdo con estos resultados, se ha reportado que la sobre-expresión de CsrA reduce la expresión de *hilD* y *hilA* (Altier et al., 2000b).

Estos resultados indican que CsrA reprime la expresión de *hilD*, *hilA* y *ssrAB* y por lo tanto la expresión del resto de los genes de SPI-1 y SPI-2. Para definir si el efecto de CsrA sobre estos genes es directo realizamos EMSAs para determinar si CsrA se une a los transcritos de *hilD*, *hilA*, *ssrAB* o *csrB*, éste último usado como control positivo, ya que se conoce que CsrA se une a este ARN en *E. coli* (Lee et al., 1997). La proteína CsrA redujo la movilidad de los ARNs de *hilD*, *ssrAB* y *csrB*, a una concentración de 1 μ M, indicando que CsrA puede unirse a estos ARNs (Figura 20A). En contraste, CsrA no se unió al ARN de *hilA* (Figura 20A). Posteriormente se determinó la afinidad del pegado de CsrA calculando la constante de disociación (K_d) de la proteína hacia el transcrito de *hilD*. El análisis de estos datos produjo un valor de K_d de 5 nM de CsrA para el ARNm de *hilD*. La especificidad de la interacción CsrA-ARN *hilD* se analizó realizando EMSAs competitivos empleando como competidores a los ARNs no marcados radioactivamente, de *hilD* o de *phoB* (un transcrito no regulado por CsrA). El transcrito no marcado de *hilD* fue un competidor efectivo, puesto que deshizo el complejo previamente formado por CsrA y el transcrito de *hilD* marcado (Figura 20B). En contraste, el transcrito de *phoB* no fue capaz de deshacer dicho complejo (Figura 20B). Estos resultados demuestran que CsrA se une específicamente al transcrito de *hilD*.

Al realizar estos experimentos con los transcritos de *ssrAB* y *csrB*, encontramos que la afinidad de CsrA hacia el ARN de *ssrAB* ($K_d=340$ nM), fue mucho menor que la encontrada para *hilD* ($K_d=5$ nM) (Figuras 20B y C). Además, aunque el fragmento no marcado de *ssrAB* fue capaz de competir con la interacción de CsrA al ARN marcado de *ssrAB*, la competencia fue muy débil (Figura 20C). Como se esperaba, CsrA se unió con gran afinidad y de manera específica al transcrito de *csrB* ($K_d=20$ pM) (Figura 20 D).

Posteriormente realizamos experimentos de protección a la ARNsa T1 (footprinting) con el fin de identificar los sitios de unión de CsrA sobre el transcrito de *hilD*. CsrA protegió 5 residuos de guanina en el transcrito de *hilD* que están sobrepuestos a la

secuencia que corresponde al sitio de unión a ribosomas (RBS o sitio Shine Dalgarno, SD) y al codón de inicio de la traducción (Met) (Figura 20E). Esto indica que CsrA se une a dos sitios sobre el transcrito de *hilD*, y a favor de esto, ambas regiones contienen el motivo GGA que se ha reportado como conservado en el consenso que reconoce CsrA sobre otros ARNs mensajeros (Babitzke y Romeo, 2007) (Figura 20E).

Estos resultados indican que CsrA reprime la expresión de *hilD*, probablemente al inhibir la unión de la subunidad ribosomal 30S.

Al bloquear la unión a ribosomas y por lo tanto la traducción, la represión traduccional mediada por CsrA frecuentemente favorece la degradación de sus transcritos blanco (Babitzke y Romeo, 2007; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008; Timmermans y Van Melderen, 2010). Por lo tanto, analizamos si la unión de CsrA aceleraba el decaimiento del ARNm de *hilD* determinando la vida media del transcrito de *hilD* en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en la mutante Δ *csrA*. Esto se determinó parando la transcripción con rifampicina y detectando posteriormente al transcrito de *hilD* mediante Northern blot. Para facilitar la detección del ARNm de *hilD*, ambas cepas fueron transformadas con el plásmido pT3-HilD, el cual contiene el gen *hilD* bajo el control de un promotor constitutivo, con el fin de incrementar la concentración celular del transcrito de *hilD*. En la figura 20F se observa que el transcrito de *hilD* fue detectado como dos bandas únicas de igual intensidad en la cepa silvestre y en la mutante Δ *csrA* inmediatamente después del tratamiento con rifampicina. Sin embargo, el ARNm de *hilD* decayó más rápido en la cepa silvestre (vida media 0.79 ± 0.05 min) comparado con la mutante *csrA* (vida media 1.54 ± 0.05 min) (Figura 20F).

En conjunto, estos resultados indican que la unión de CsrA al transcrito de *hilD* podría bloquear su traducción y además acelerar su degradación. Además, al reducir la síntesis de HilD, CsrA afecta también la autoregulación positiva de HilD (Olekhovich y Kadner, 2002; Ellermeier *et al.*, 2005), reduciendo así también su transcripción. Nuestros resultados sugieren además que la represión de *hilA* y *ssrAB* por CsrA es indirecta, en estas condiciones de crecimiento que favorecen la activación dependiente de HilD de los regulones de SPI-1 y SPI-2.

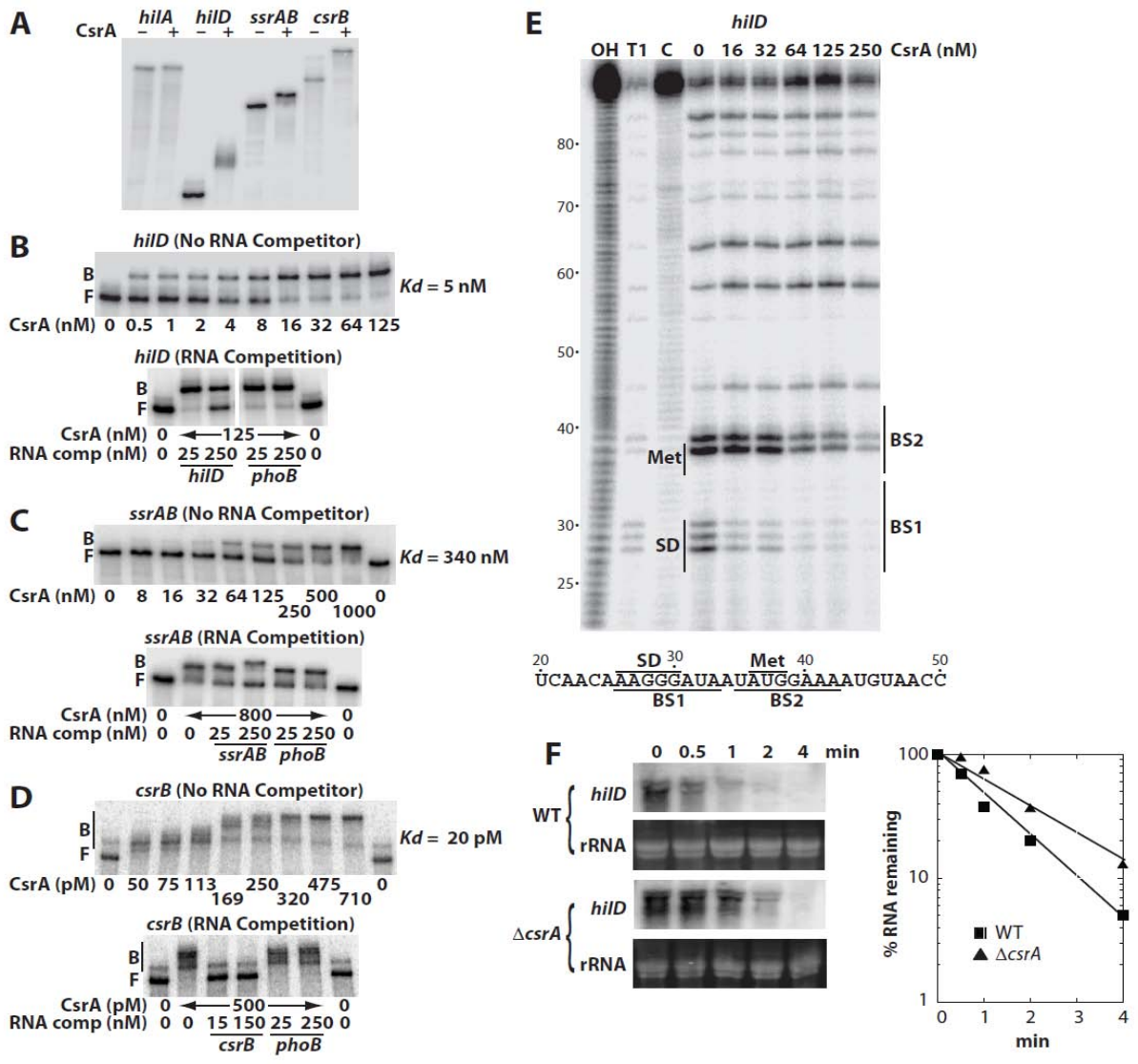


Figura 20. Interacción de CsrA con el ARNm de *hilD*. (A, B, C y D) Los EMSAs de CsrA con el ARN de *hilA*, *hilD*, *ssrAB* or *csrB* ARN se realizaron incubando fragmentos marcados de ARN de cada gen en ausencia (-) o presencia (+) de CsrA. Se marcan las posiciones de los fragmentos libres (F) o unidos (B). Para los ensayos de competencia, los fragmentos marcados de *hilD*, *csrB* o *ssrAB* fueron incubados con la proteína purificada CsrA en ausencia o presencia de competidores específicos (*hilD*, *csrB* o *ssrAB*) o no específicos (*phoB*), no marcados. (E) El análisis de footprinting para la interacción CsrA-*hilD* fue hecho empleando las concentraciones de CsrA anotadas arriba de cada línea. Se muestra la hidrólisis parcial alcalina (OH) y la digestión con ARNsa T₁ (T1), así como un carril de control sin la ARNsa T₁ (C). Se muestra también la secuencia del extremo 5' de *hilD*, con los sitios de unión de CsrA (BS1 y BS2), el sitio Shine-Dalgarno (SD) y el codón de inicio de la traducción (Met). (F) Northern blot que muestra la estabilidad del ARNm de *hilD* en la cepa silvestre y en la mutante $\Delta csrA$, después de bloquear la transcripción con rifampicina. Como control de carga se muestra la concentración de ARN ribosomal de las muestras analizadas. La gráfica muestra la cuantificación del ARN de *hilD* en la cepa silvestre y la mutante $\Delta csrA$ a diferentes tiempos.

5.2. Regulación de *csrB* y *csrC* mediada por SirA e IHF

Aún cuando se sabe que SirA induce la expresión de *csrB* y *csrC*, uniéndose a la región reguladora de *csrB* (Teplitski *et al.*, 2003, Teplitski *et al.*, 2006) y, como lo demostramos en este proyecto, también a la de *csrC*, a la fecha no se conoce la secuencia que reconoce SirA en estos genes o si hay otros reguladores involucrados en su expresión. Así, con el fin de delimitar la región de *csrB* que se requiere para su regulación por SirA y para comenzar a dilucidar el mecanismo por el cual SirA induce la expresión de *csrB*, construimos fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, que contienen distintos segmentos de la región reguladora de *csrB* (Figura 21A).

La expresión de estas fusiones transcripcionales fue analizada en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en la cepa mutante $\Delta sirA$. Las fusiones -370 y -230 se expresaron a un nivel similar en la cepa silvestre; en contraste, no hubo inducción de la expresión de las fusiones -170, -114 y -50 (Figura 21B). Estos resultados muestran que cuando se elimina la región de *csrB* comprendida entre las posiciones -230 y -170, con respecto al inicio de su transcripción, se disminuye drásticamente su expresión en la cepa silvestre (Figura 21B), lo cual indica que la región -230/-170 contiene secuencias de control positivo de *csrB*. Las fusiones -370 y -230, que contienen la región -230/-170, se expresaron en la cepa silvestre pero no en la mutante $\Delta sirA$ (Figura 21B), sugiriendo entonces que esta región podría mediar la regulación de *csrB* por SirA.

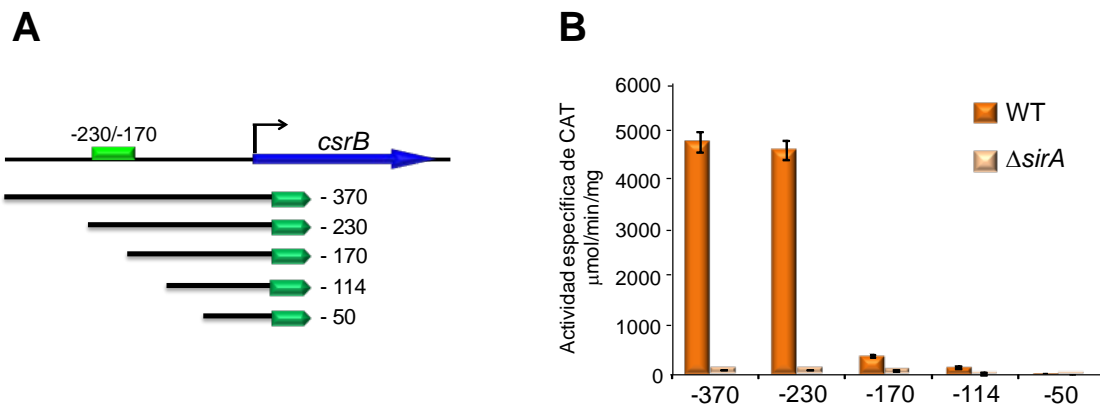


Figura 21. SirA regula a *csrB* y requiere para ello la región comprendida entre las posiciones -230 y -170. (A) Mapa de las fusiones transcripcionales que contienen diferentes regiones de la región reguladora de *csrB*. (B) La expresión de las diferentes fusiones transcripcionales *csrB-cat* fue analizada en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y su derivada mutante $\Delta sirA$, a partir de muestras de cultivos crecidos durante 5 horas en LB. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes. Las barras representan las desviaciones estándar.

Para determinar si SirA se une a la región -230/-170 de *csrB* realizamos EMSAs con la proteína MBP-SirA purificada y los fragmentos de *csrB* contenidos en las diferentes fusiones *csrB-cat*. En apoyo a nuestro análisis de expresión de las fusiones *csrB-cat*, la proteína MBP-SirA se unió a los fragmentos de *csrB* que contienen la región -230/-170 (los fragmentos de las fusiones -370 y -230) pero no a aquellos que carecen de ésta (los fragmentos de las fusiones -170 y -114) (Figura 22A, B, C y D).

Estos resultados indican que SirA se une a la región comprendida entre las posiciones -230 y -170, con respecto al inicio de transcripción de *csrB*.

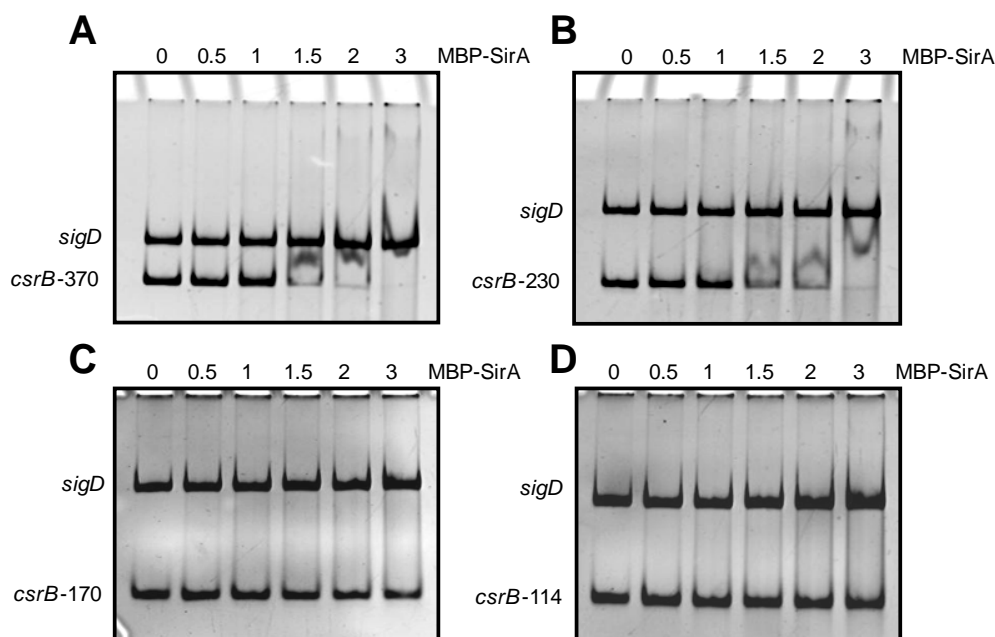


Figura 22. SirA se une a la región de *csrB* localizada entre las posiciones -230 y -170. Los fragmentos contenidos en las diferentes fusiones transcripcionales de *csrB-cat* fueron amplificados para realizar EMSAs con concentraciones crecientes de la proteína MBP-SirA purificada (0.5, 1, 1.5, 2 y 3 μM). Como control negativo, el fragmento de *sigD* fue agregado en cada reacción. Los complejos DNA-proteína fueron visualizados en geles de acrilamida al 6%.

En un análisis bioinformático que se realizó en otro de los proyectos del laboratorio, se encontró una secuencia de 9 pb que se conserva en *csrB* y *csrC*, así como en sus ortólogos (Figura 23A). En *csrB* esta secuencia se encuentra repetida, formando una secuencia palindrómica localizada precisamente en la región -230/-170 (Figura 23B).

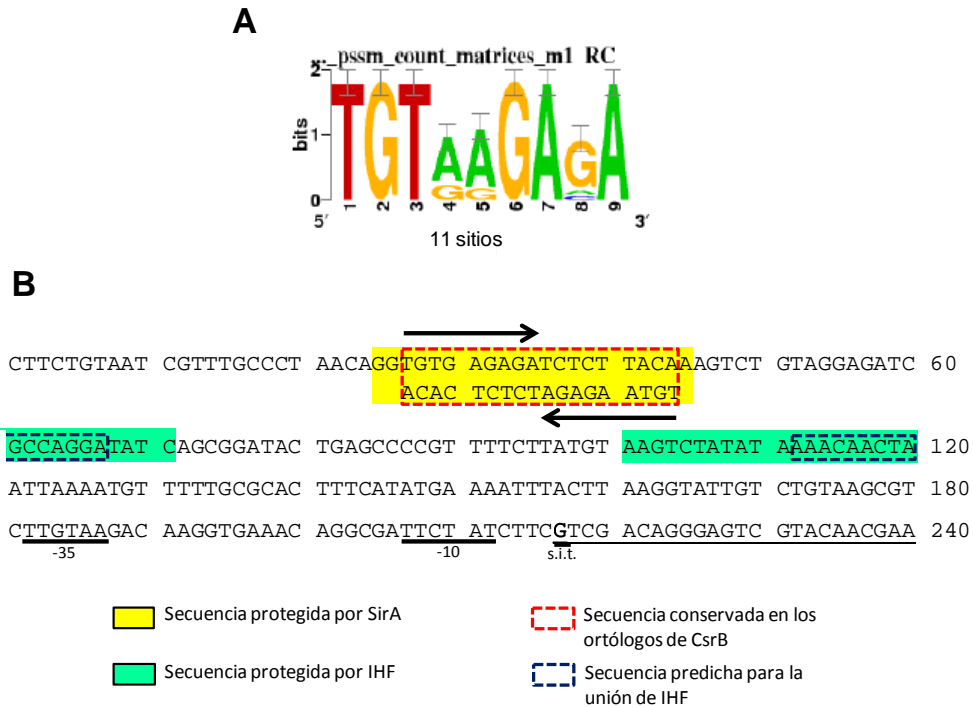


Figura 23. Secuencia conservada en la región reguladora de *csrB*. (A) Secuencia conservada en *csrB*, *csrC* y sus ortólogos, definida mediante análisis bioinformático. (B) Secuencia de la región reguladora de *csrB* en la que se indica la secuencia conservada palindrómica (flechas negras, recuadro punteado rojo), la secuencia putativa de reconocimiento por IHF (recuadro punteado azul), obtenida por análisis de bioinformática, y las secuencias protegidas por SirA e IHF en amarillo y verde, respectivamente, determinadas mediante ensayos de protección a la DNAsa. Se indica también el inicio de transcripción (s.i.t.) y las cajas -10 y -35 de la región promotora de *csrB*.

Para determinar si SirA reconoce esta secuencia conservada realizamos un experimento de protección a la DNAsa con la proteína MBP-SirA purificada y un fragmento que contiene la región reguladora de *csrB*. En la figura 24 se observa que la región protegida por SirA en un ensayo de protección a la DNAsa, contiene la secuencia palindrómica conservada que fue determinada en el análisis bioinformático.

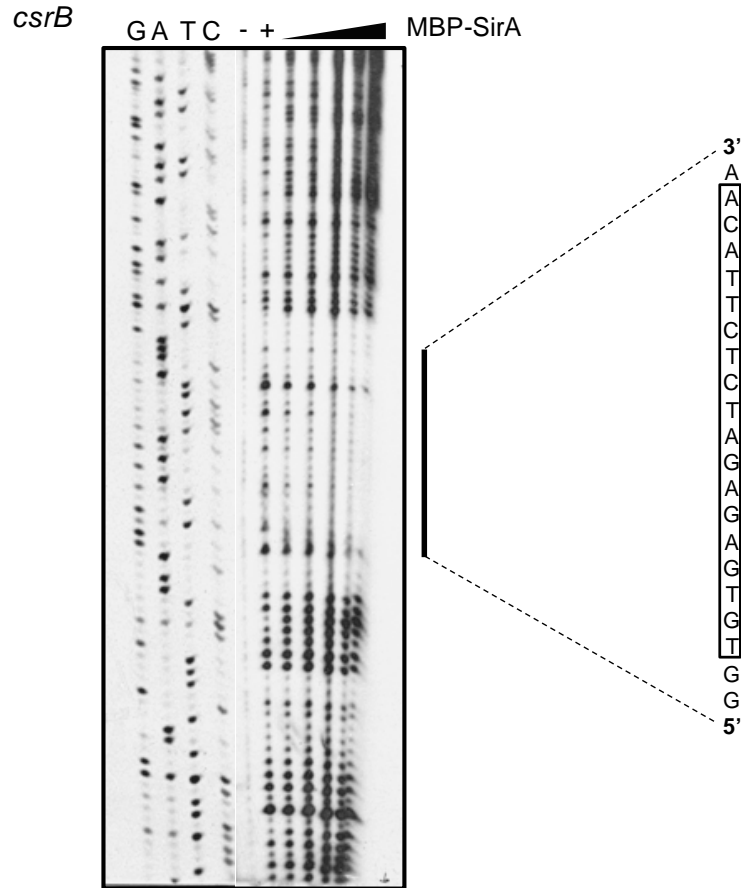


Figura 24. Secuencia reconocida por SirA sobre *csrB*. Ensayo de protección a la DNasa empleando la proteína MBP-SirA y la región reguladora de *csrB*. Las concentraciones de MBP-SirA fueron las mismas que se emplearon para realizar los ensayos de retardamiento en gel (0.5, 1, 1.5, 2 y 3 μ M). Se muestra la secuencia que fue protegida por MBP-SirA y encerrada en un recuadro se indica la secuencia palindrómica conservada en *csrB*, determinada por análisis bioinformáticos.

En conjunto, estos resultados indican que SirA induce la expresión de *csrB* uniéndose a la secuencia 5'- TGTGAGAGATCTCTTACA -3' localizada entre las posiciones -173 y -190, con respecto al inicio de la transcripción de este gen. Como esta secuencia es palindrómica, analizamos si SirA se une a *csrB* como dímero. Para esto utilizamos el sistema de dos híbridos bacteriano basado en el regulador transcripcional LexA. LexA es un represor que consta de un dominio de dimerización, ubicado en la región C-terminal, y un dominio de unión al ADN, en la región N-terminal; este regulador requiere dimerizar para reprimir la expresión de sus genes blanco. El sistema de dos híbridos bacterianos se basa en la expresión del dominio de unión a DNA de LexA (LexA_{DBD}), a partir de plásmido, el cual no es capaz de reprimir a sus genes blanco; sin

embargo, fusionado a una proteína que dimeriza, este dominio puede llevar a cabo la represión. Así, para evaluar si SirA dimeriza, se construyó el plásmido pSR660-SirA, que expresa al LexA_{DBD} fusionado al extremo N-terminal de SirA (LexA_{DBD}-SirA). La cepa que se usa en este sistema es *E. coli* SU101, que contiene una fusión cromosomal *sulA-lacZ*, cuya expresión se reprime por la proteína LexA silvestre, o por el LexA_{DBD} fusionado a una proteína que dimeriza. Así, como control negativo y positivo de dimerización, respectivamente, usamos el vector pSR660, que expresa al LexA_{DBD} (no dimeriza), y el plásmido pSR658-HNS, que expresa al LexA_{DBD} fusionado a H-NS (LexA_{DBD}-H-NS), una proteína de la que se conoce su capacidad de dimerizar.

La cepa *E. coli* SU101 se transformó con los plásmidos pSR660-SirA o pSR658-HNS, o con el vector pSR660, y se determinó en las transformantes la actividad de la enzima β -galactosidasa expresada a partir de la fusión *sulA-lacZ*. Las proteínas LexA_{DBD}-SirA y LexA_{DBD}-H-NS expresadas a partir del respectivo plásmido (Fig. 25B) reprimieron drásticamente la expresión de la fusión *sulA-lacZ*, comparando con la expresión de esta fusión en presencia del vector pSR660 (Fig. 25A), lo cual indica que ambas proteínas, SirA y H-NS son capaces de dimerizar. Así, como podría esperarse, estos resultados indican que la forma dimérica de SirA es la que se une a la secuencia palindrómica en *csrB*.

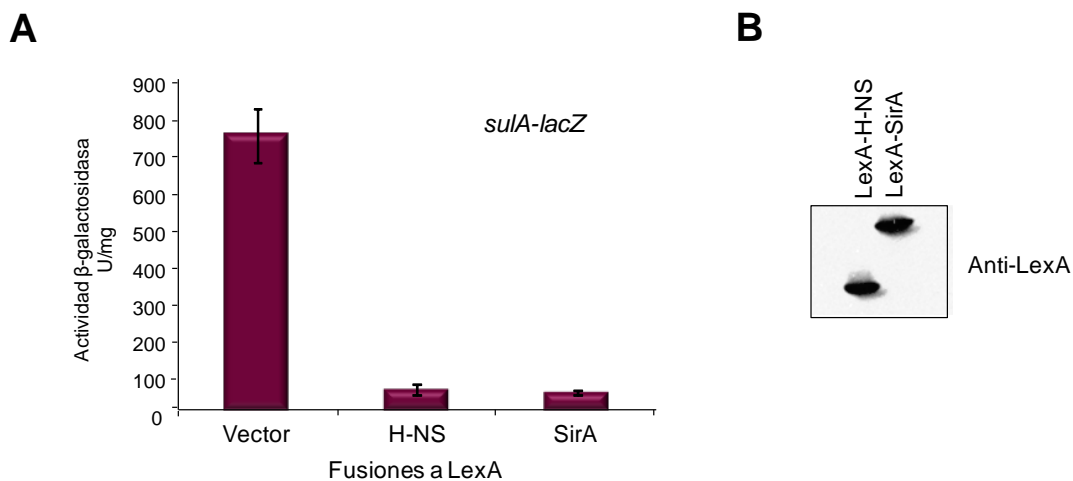


Figura 25. SirA es capaz de dimerizar. (A) Expresión de la fusión reportera *sulA-lacZ* en la cepa SU101 de *E. coli* en presencia del vector pSR660 o de los plásmidos pSR658-HNS y pSR660-SirA que expresan a las proteínas de fusión LexA_{DBD}-HNS y LexA_{DBD}-SirA, respectivamente. Las cepas se crecieron en el medio de cultivo LB suplementado con 1 mM de IPTG durante 4 horas y posteriormente se determinó la actividad β -galactosidasa. Los datos representan el promedio de tres experimentos realizados por separado. (B) Inmunodetección de las proteínas de fusión LexA_{DBD}-HNS y LexA_{DBD}-SirA mediante el anticuerpo anti-LexA a partir de muestras tomadas de los cultivos para el análisis de β -galactosidasa.

La mayoría de proteínas reguladoras que actúan como activadores transcripcionales clásicos generalmente se unen a sitios muy cercanos al promotor, ya que su papel principal es interaccionar con la ARN polimerasa (ARNpol) y así ayudarla a unirse a las cajas promotoras (-10 y -35, para el caso de los promotores dependientes de sigma 70) (Browning and Busby, 2004). Algunos activadores transcripcionales se unen a sitios lejanos al promotor que regulan, pero en estos casos requieren de la ayuda de otra proteína reguladora que se une entre el sitio de unión del activador y el promotor e inducen un doblamiento en el DNA, lo cual acerca al activador que está unido a su sitio, al promotor y así puede llevar a cabo su función (Browning and Busby, 2004). La secuencia que reconoce SirA en *csrB* está localizada 173 pb corriente arriba del promotor, lo que se puede considerar como un sitio de unión lejano al promotor. De manera interesante, mediante análisis de bioinformática se encontró un posible sitio de unión para el regulador IHF, justamente en la región localizada entre el promotor y el sitio de unión de SirA en *csrB* (Figura 23B).

IHF es un regulador del grupo de “proteínas asociadas al nucleóide” que contribuye a la organización del genoma y al control de procesos como la transcripción, replicación, recombinación sitio específica y transposición, al reconocer una secuencia específica e inducir doblamientos en el DNA que favorecen estos procesos biológicos (Swinger y Rice, 2004). En *Salmonella*, se ha reportado que IHF controla positivamente la expresión de los genes *hilD* y *hilA* de SPI-1, sin embargo, no se ha definido si los regula directa o indirectamente (Mangan *et al.*, 2006).

Con base en estos antecedentes, decidimos analizar si el regulador IHF está involucrado en la regulación de *csrB*. Para investigar esto, construimos las mutantes Δ *himA* y Δ *himD* de *S. Typhimurium*, a las cuales se les removió uno de los genes, *himA* o *himD* respectivamente, que codifican para las dos subunidades que componen a IHF, IHFA e IHFB, respectivamente. En estas dos mutantes se redujo la expresión de la fusión *csrB-cat* (Figura 26A). Por otro lado, mediante EMSAs demostramos que la proteína IHF purificada se une a la región reguladora de *csrB* (Figura 26B). Además, mediante un experimento de protección a la DNAsa demostramos que IHF se une a la secuencia 5'-AAACAATAATTAATAA -3' predicha por el análisis de bioinformática como sitio de unión de este regulador (Figura 26C), localizada entre el sitio de unión de SirA y el promotor de *csrB* (Figura 23B).

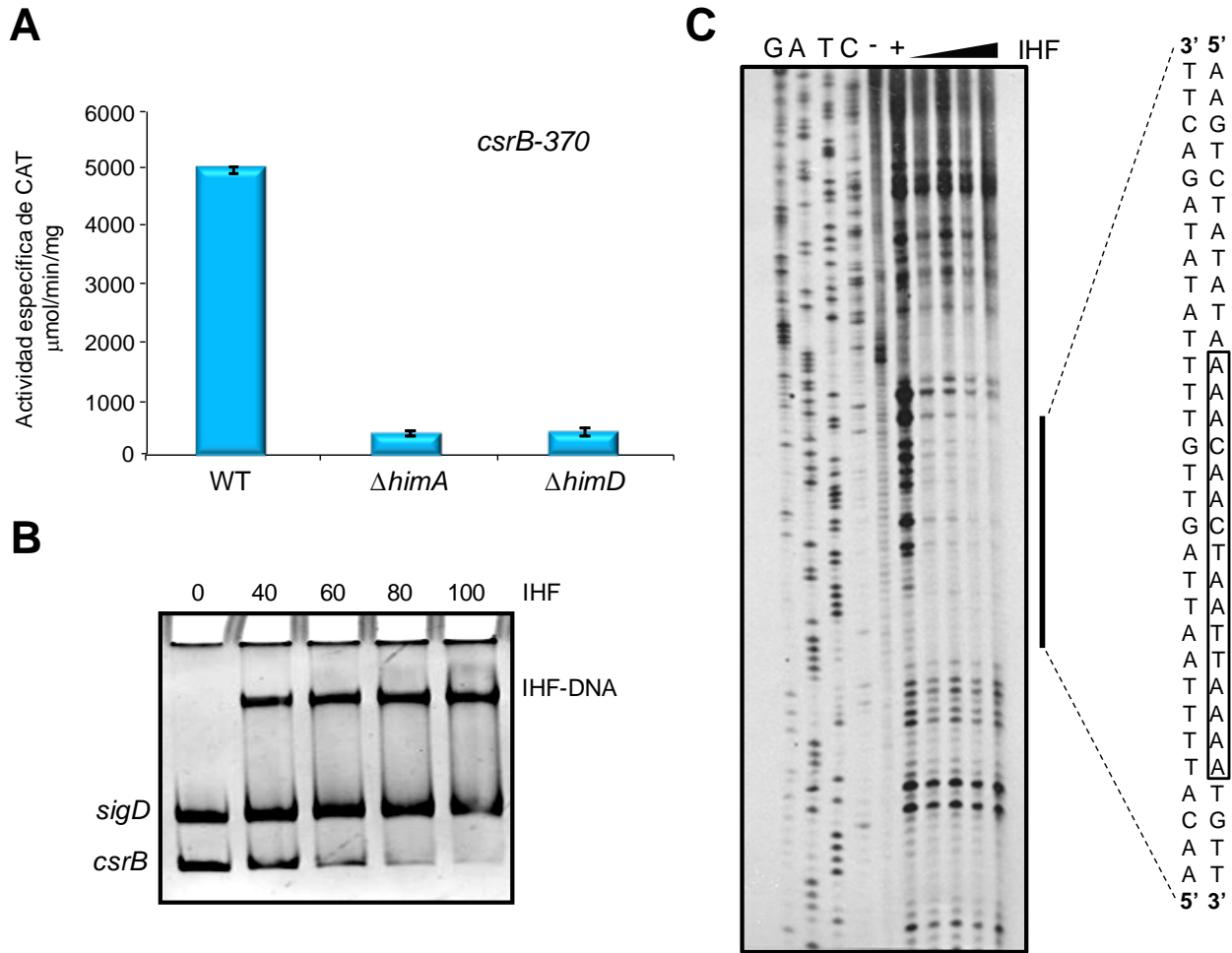


Figura 26. IHF regula a *csrB* al unirse directamente a su región reguladora. (A) Expresión de la fusión *csrB-cat* en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* así como en sus derivadas mutantes ΔhimA y ΔhimD , genes que codifican las dos subunidades de IHF. Las cepas se crecieron en LB durante 5 horas. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. (B) EMSA con la región reguladora de *csrB* y concentraciones crecientes de la proteína IHF purificada (40, 60, 80 y 100 nM). Como control negativo se empleó un fragmento de *sigD*, que no es regulado directamente por IHF. (C) Ensayo de protección a la DNasa empleando la proteína IHF y la región reguladora de *csrB*. Las concentraciones de IHF fueron las mismas que se emplearon para realizar los ensayos de retardamiento en gel (40, 60, 80 y 100 nM). Se muestra la secuencia que fue protegida por IHF y encerrada en un recuadro se indica la secuencia predicha por el análisis de bioinformática como sitio de unión de este regulador.

En conjunto, estos resultados indican que IHF regula de manera directa, en coordinación con SirA, la expresión de *csrB*. Así, ya que CsrB se requiere para la expresión de los genes de SPI-1, IHF y SirA controlan de manera indirecta a estos genes. Estos resultados nos han permitido integrar un regulador más en la compleja cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 (Figura 39).

5.3. Secuencias en *cis* que se requieren para la regulación del operón *ssrAB* mediada por HilD y H-NS

En un trabajo previo demostramos que HilD, un regulador de los genes de SPI-1 codificado en esta misma isla, controla directamente la expresión del operón *ssrAB* y por tanto de los genes de SPI-2, cuando *Salmonella* crece en el medio de cultivo LB, estableciéndose de esta manera una comunicación entre SPI-1 y SPI-2 (Bustamante *et al.*, 1998). En este mismo trabajo también demostramos que en ausencia de H-NS ya no se requiere de la presencia de HilD para que se exprese *ssrAB*, lo que sugiere que HilD induce la expresión de este operón contrarrestando la represión que H-NS ejerce sobre su promotor; sin embargo, aún en ausencia de H-NS se requiere del regulador OmpR para la expresión de *ssrAB* (Bustamante *et al.*, 2008). Esto hace que la regulación del operón *ssrAB* sea un modelo interesante para estudiar la acción concertada de dos reguladores positivos, HilD, el cual actúa como un des-represor de H-NS, y OmpR, que ha sido descrito como un activador clásico.

Para definir las secuencias en *cis* que se requieren para la regulación de *ssrAB* mediada por HilD, H-NS y OmpR, primeramente construimos y analizamos la expresión de una fusión *ssrAB-cat* (fusión +478) en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en sus derivadas mutantes $\Delta hilD$ y $\Delta ompR$. La expresión de esta fusión, que contiene la región -302 a +478 de *ssrAB*, con respecto a su inicio de la transcripción, disminuyó en las mutantes $\Delta hilD$ y $\Delta ompR$, y su expresión se restauró en presencia de un plásmido que expresa a HilD u OmpR, en la respectiva mutante (Figura 27). Estos resultados indican que la región -302/+478 contiene las secuencias necesarias para la regulación de *ssrAB* mediada por HilD y OmpR. Ya que la función de HilD es contrarrestar la represión de H-NS, estos resultados también indican que las secuencias necesarias para la represión de *ssrAB* mediada por H-NS están contenidas en la región -302/+478. Esto es consistente con nuestros previos resultados que muestran que HilD y H-NS se unen a esta región de *ssrAB* (Bustamante *et al.*, 2008), así como con resultados reportados por otros grupos que muestran que OmpR también interactúa con esta región de *ssrAB* (Lee *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2003).

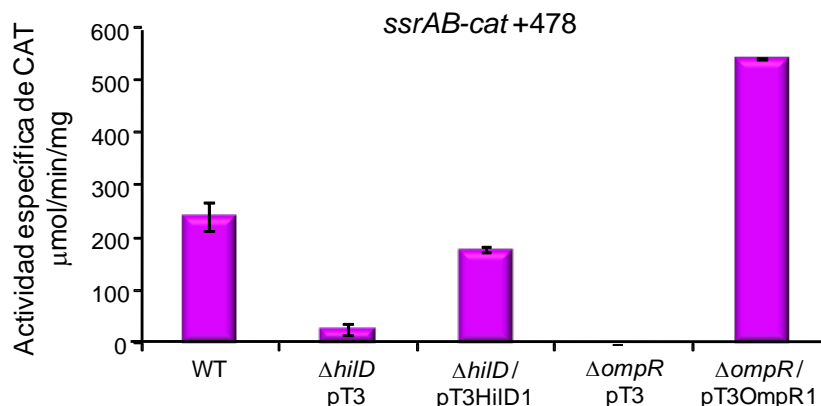


Figura 27. La región comprendida entre las posiciones -302 y +478 de *ssrAB*, contiene los elementos necesarios para su regulación por HilD y OmpR. Expresión de la fusión *ssrAB-cat +478* (que contiene la región -302 a +478 de *ssrAB*, con respecto a su sitio de inicio de la transcripción), en mutantes en $\Delta hilD$ y $\Delta ompR$ con plásmidos que expresan a HilD u OmpR o con el vector pT3. Las cepas se crecieron en LB durante 10 horas a 37°C. Los resultados son el promedio de tres experimentos realizados por duplicado. Las barras representan la desviación estándar.

Para determinar los elementos en *cis* que se requieren para la regulación de *ssrAB* mediada por HilD, H-NS y OmpR seguimos dos estrategias principales. Por un lado, analizamos la expresión de fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* que contienen diferentes segmentos de la región -302/+478 de *ssrAB*, en cepas que expresan o no a HilD, H-NS u OmpR. Así mismo, analizamos la interacción de las proteínas HilD y H-NS con diferentes segmentos de la región reguladora de *ssrAB*, comprendida entre las posiciones -302 y +478.

5.3.1. Análisis de la expresión de fusiones transcripcionales que contienen diferentes regiones de la región reguladora de *ssrAB*

Se construyeron varias fusiones *ssrAB-cat* que carecen de diferentes regiones del extremo 3', con respecto a la fusión +478 (Figura 28) y su expresión se analizó en la cepa WT de *S. Typhimurium* y en sus derivadas mutantes $\Delta hilD$ y $\Delta ompR$ crecidas en LB.

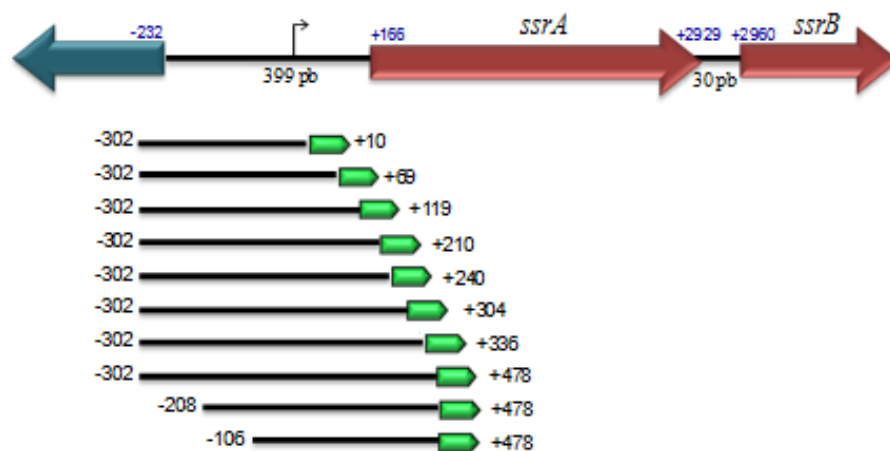


Figura 28. Representación esquemática de las fusiones transcripcionales *ssrAB-cat* derivadas de la fusión +478, que contienen diferentes segmentos de la región reguladora de *ssrAB*. Los números indican las posiciones relativas al sitio de inicio de la transcripción (+1) de *ssrAB*. Las fusiones con recortes en el extremo 3' fueron nombradas de acuerdo a su posición en este extremo, mientras que las fusiones con recorte en el extremo 5' fueron nombradas de acuerdo a su posición en este extremo.

Como se muestra en la figura 29, en términos generales cuando se elimina la región entre las posiciones +478 y +10 la expresión de *ssrAB* se vuelve independiente de HilD. Esto es evidente al comparar la expresión de la fusiones +478 y +10, que contienen o no la región +478/+10 respectivamente. La expresión de la fusión +478 se disminuye alrededor de 5 veces en la mutante $\Delta hilD$, con respecto a la cepa WT, mientras que la expresión de la fusión +10 incluso es mayor en la mutante $\Delta hilD$ que en la cepa WT (Figura 29). Estos resultados demuestran que en la región +478/+10 se encuentran secuencias de control negativo para la expresión de *ssrAB*; además, indican que en ausencia de estas secuencias ya no se requiere a HilD para la expresión de este operón.

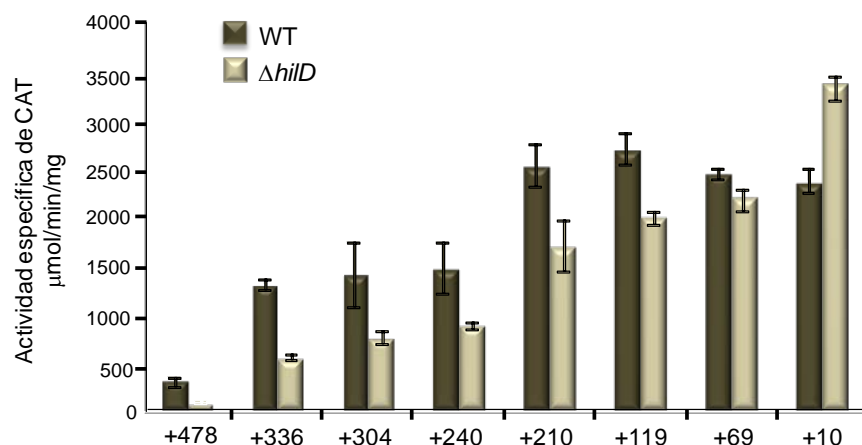


Figura 29. Secuencias reguladoras negativas, requeridas para la regulación de *ssrAB* mediada por HilD, se encuentran corriente abajo del promotor de *ssrAB*. La expresión de las diferentes fusiones transcripcionales *ssrAB-cat* se analizó en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en su derivada mutante $\Delta hilD$. La actividad específica de CAT se determinó de muestras tomadas de cultivos crecidos en LB durante 10 horas. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes hechos por duplicado. Las barras representan las desviaciones estándar.

Quando las cepas se crecieron en MM-N, la expresión de todas las fusiones *ssrAB-cat* fue similar en la cepa WT y en la mutante $\Delta hilD$ (Figura 30), lo cual es consistente con nuestros resultados publicados previamente, que indican que HilD no se requiere para la expresión de los genes de SPI-2 cuando se crece a *Salmonella* en medios mínimos, como el MM-N (Bustamante *et al.*, 2008).

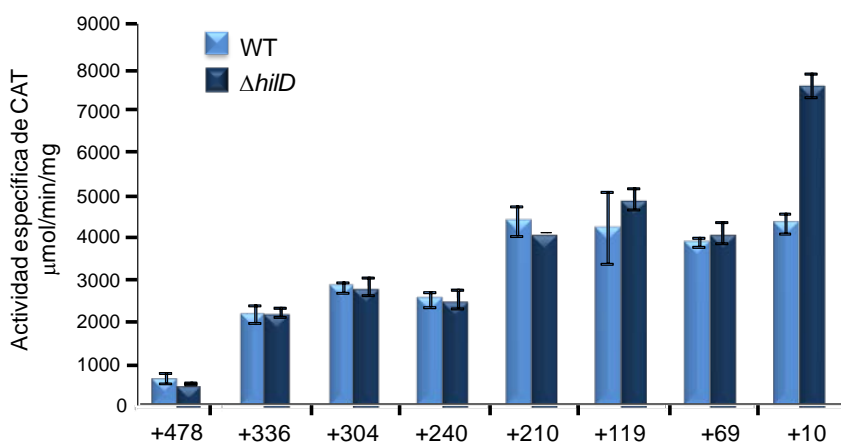


Figura 30. En medio mínimo no se requiere a HilD para la expresión de *ssrAB*. La expresión de las diferentes fusiones transcripcionales *ssrAB-cat* se analizó en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y su derivada mutante $\Delta hilD$ crecidas en el medio mínimo MM-N. La actividad específica de CAT se determinó de muestras tomadas de cultivos crecidos durante 16 horas. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes hechos por duplicado. Las barras representan las desviaciones estándar.

En contraste a lo observado en la mutante $\Delta hliD$, la expresión de todas las fusiones *ssrAB-cat* disminuyó en la mutante $\Delta ompR$ con respecto a su expresión en la cepa silvestre, cuando las cepas se crecieron tanto en LB (Figura 31) como en MM-N (Figura 32). Estos resultados indican que OmpR actúa en la región -302/+10 (región contenida en la fusión *ssrAB-cat* +10) para inducir la expresión de *ssrAB*. Además, confirman que OmpR se requiere para la expresión de *ssrAB* tanto en LB como en MM-N, como lo habíamos reportado previamente (Bustamante *et al.*, 2008).

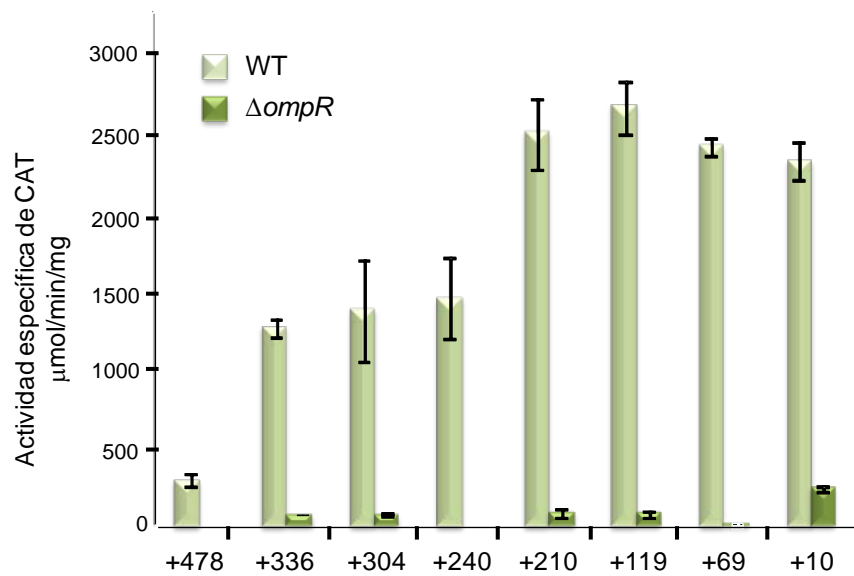


Figura 31. OmpR se requiere para la expresión de *ssrAB* en LB, aún en ausencia de la región +478/+10. La expresión de las diferentes fusiones transcripcionales *ssrAB-cat* se analizó en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y su derivada mutante *ompR*. La actividad específica de CAT se determinó de muestras tomadas de cultivos crecidos en LB durante 10 horas. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes hechos por duplicado. Las barras representan las desviaciones estándar.

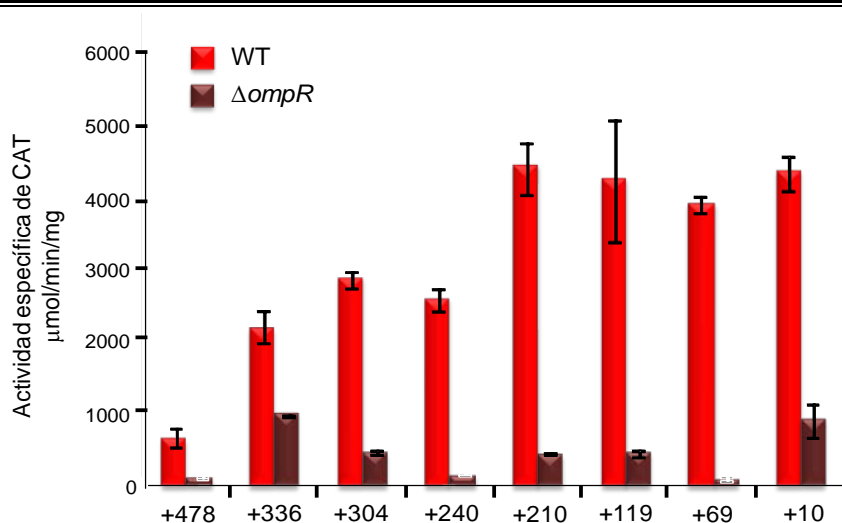


Figura 32. OmpR se requiere para la expresión de *ssrAB* en MM-N, aún en ausencia de la región +478/+10. La expresión de las diferentes fusiones transcripcionales *ssrAB-cat* se analizó en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y su derivada mutante $\Delta ompR$ crecidas en el medio mínimo de cultivo MM-N. La actividad específica de CAT se determinó de muestras tomadas de cultivos crecidos en LB durante 16 horas. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes hechos por duplicado. Las barras representan las desviaciones estándar.

Para determinar si las secuencias de control negativo localizadas en la región +478/+10 median la represión de *ssrAB* por H-NS, analizamos la expresión de las fusiones *ssrAB-cat* en una cepa WT de *Escherichia coli* K12 y en su derivada mutante Δhns . Esto se hizo así porque en *S. Typhimurium* SL1344 la remoción de *hns* es letal y sólo puede obtenerse cuando se realizan mutaciones en otros reguladores que afectan la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 (Navarre *et al.*, 2006).

E. coli contiene a OmpR, el cual es idéntico a OmpR de *S. Typhimurium*, pero no contiene a HiiD. Así, como se esperaba la fusión *ssrAB-cat* +478 no se expresó en la cepa WT de *E. coli*; en contraste, esta fusión se expresó en la mutante *E. coli* Δhns , a un nivel incluso mayor que en la cepa WT de *S. Typhimurium* (Figura 33). Estos resultados son consistentes con nuestros resultados previos que indican que en ausencia de H-NS ya no se requiere a HiiD para la expresión de *ssrAB* (Bustamante *et al.*, 2008). Así mismo, revelan que no se requiere de algún otro regulador positivo específico de *Salmonella* (diferente a HiiD) para la expresión de *ssrAB*.

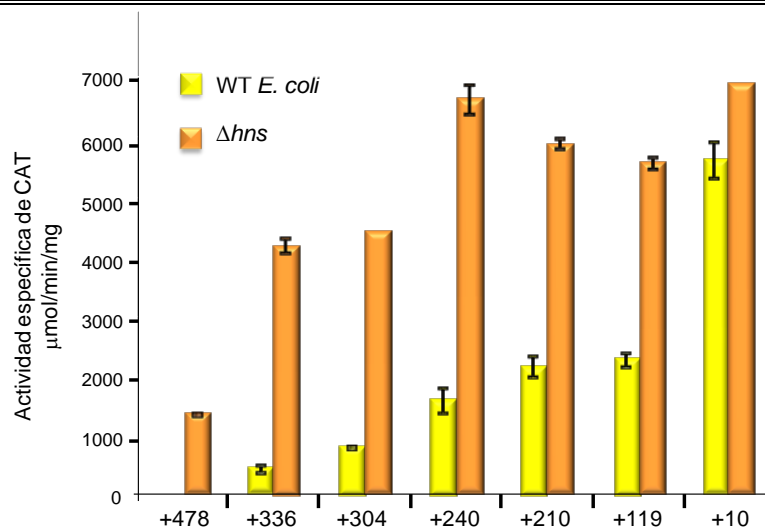


Figura 33. H-NS requiere de la región +478/+10 para reprimir la expresión de *ssrAB*. La expresión de las diferentes fusiones transcripcionales *ssrAB-cat* se analizó en la cepa silvestre de *E. coli* MC4100 y su derivada mutante Δhns . La actividad específica de CAT se determinó de muestras tomadas de cultivos crecidos en LB durante 10 horas. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes hechos por duplicado. Las barras representan las desviaciones estándar.

Con la eliminación gradual del extremo 3' de la región +478/+10 hay un incremento gradual en la expresión de las fusiones *ssrAB-cat* en la cepa WT de *E. coli*, indicando que se van eliminando diferentes secuencias de control negativo (Figura 33). Sin embargo, en la mutante *E. coli* Δhns las fusiones *ssrAB-cat* se expresaron a un nivel similar entre ellas, con excepción de la fusión +478, cuya expresión fue menor a la de las otras fusiones (Figura 33). La fusión +10 se expresó a un nivel similar en la cepa de *E. coli* WT y en su derivada mutante Δhns , indicando que esta fusión ya no contiene las secuencias que requiere H-NS para reprimir la expresión de *ssrAB*. Así, con base en los tres incrementos principales observados en la expresión de las fusiones en la cepa WT de *E. coli* (de la fusión +478 a la +336, de la +304 a la +240 y de la fusión +119 a la +10), y a su expresión observada en ausencia de H-NS, estos resultados podrían sugerir que las secuencias localizadas en las regiones +478/+336, +304/+240 y +119/+10 median la represión de *ssrAB* por H-NS. El hecho que la expresión de la fusión +478 no se liberó completamente en la mutante Δhns , como sucedió con la expresión de las otras fusiones, podría indicar que en la región +478/+336 existen secuencias que median represión de *ssrAB* por un represor diferente a H-NS, el cual estaría presente tanto en *S. Typhimurium* como en *E. coli*.

Por otro lado, analizamos la expresión de fusiones transcripcionales *ssrAB-cat* que tienen recortes en el extremo 5' con respecto a la fusión +478 (Figura 28), en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en sus derivadas mutantes $\Delta hilD$ y $\Delta ompR$. El extremo 5' de las fusiones analizadas corresponde a las posiciones -302 (fusión +478), -208 ó -106, con respecto al inicio de la transcripción de *ssrAB* (Figura 28). Como se muestra en la figura 34, la expresión de estas fusiones disminuyó en las mutantes $\Delta hilD$ y $\Delta ompR$, con respecto a su expresión en la cepa WT, indicando que la secuencia localizada corriente arriba del promotor de *ssrAB* no es necesaria para su regulación por HilD y OmpR. Estos resultados delimitan más la región que habíamos definido por medio del análisis de la expresión de las fusiones con recortes en el extremo 3', e indican que OmpR actúa en la región -106/+10 para inducir la expresión de *ssrAB*. En resumen, el análisis de fusiones transcripcionales con diferentes regiones de *ssrAB* nos permitió definir que la región +10/+478 se requiere para la regulación de *ssrAB* mediada por HilD y H-NS, mientras que la región -106/+10 se requiere para su regulación mediada por OmpR. Así mismo, este análisis reveló la existencia de tres regiones de control negativo, +10/+119, +240/+304 y +336/+478, localizadas corriente abajo del promotor de *ssrAB*.

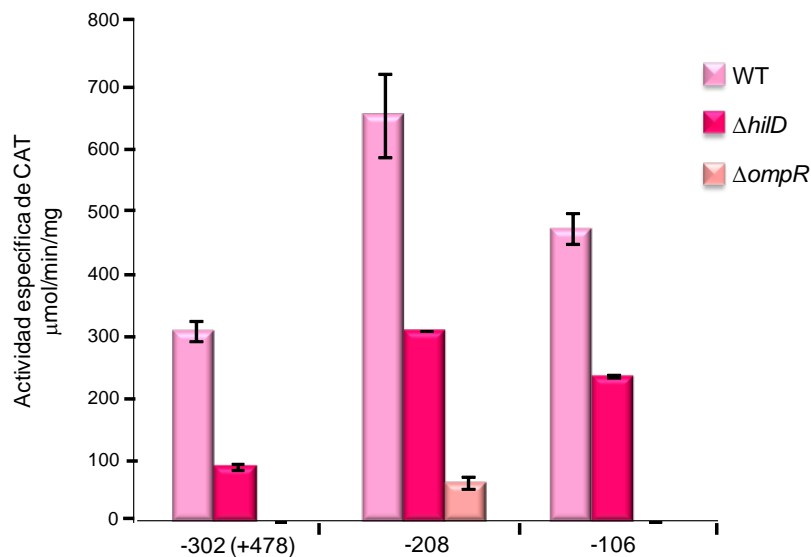


Figura 34. La secuencia contenida corriente arriba del promotor de *ssrAB* no es requerida para su regulación mediada por HilD y OmpR. La expresión de diferentes fusiones transcripcionales con recortes en el extremo 5' de *ssrAB* se analizó en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y sus derivadas mutantes $\Delta hilD$ u $\Delta ompR$. La actividad específica de CAT se determinó de muestras tomadas de cultivos crecidos en LB durante 10 horas. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes hechos por duplicado. Las barras representan las desviaciones estándar.

5.3.2. Ensayos de interacción de HiID y H-NS con diferentes regiones de *ssrAB*

Como mostramos en este estudio, una fusión de *ssrAB-cat* que contiene la región -302/+478 se regula por HiID y H-NS (Figuras 27, 29 y 33). Así mismo, en un estudio previo demostramos que HiID y H-NS interactúan con esta región (Bustamante *et al.*, 2008). Para determinar las regiones de *ssrAB* con las que interactúan HiID y H-NS realizamos experimentos de EMSAs, usando las proteínas purificadas MBP-HiID y H-NS-6xHis y diferentes segmentos de la región -302/+478 de *ssrAB*. Para esto, primero se obtuvieron por PCR 5 fragmentos de la región -302/+478, que se superponen en aproximadamente 50 bp en sus extremos y así juntos abarcan la región -302/+478 completa (Figura 35).

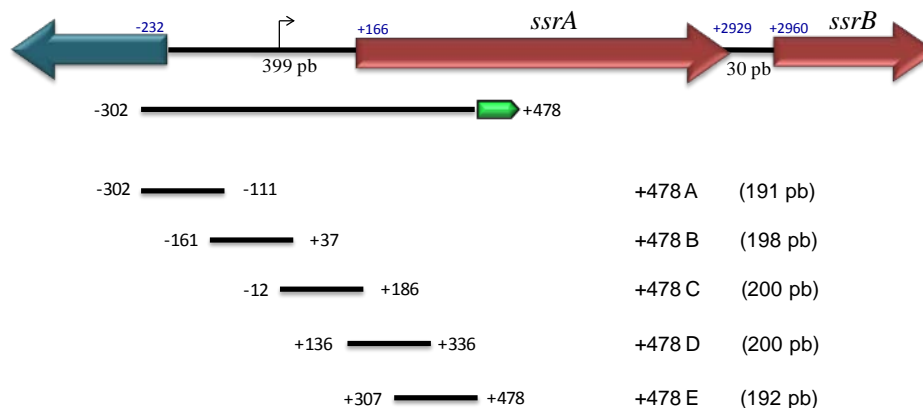


Figura 35. Representación esquemática de los fragmentos obtenidos a partir de la región -302/+478, usados en los EMSAs. Se indican las posiciones de los extremos de cada fragmento, con respecto al inicio de transcripción de *ssrAB*. A la derecha se indica el nombre del fragmento, así como su tamaño en pb.

En los experimentos tipo EMSA se analizó la interacción de MBP-HiID con estos fragmentos de *ssrAB*. Como control negativo se empleó un fragmento que contiene la región reguladora de *sigD*, un gen que no es regulado directamente por HiID o H-NS. Como se observa en la figura 36, la proteína MBP-HiID se unió de manera específica a los fragmentos +478B, +478C y +478D (Figuras 36B, C y D), que abarcan las posiciones -161 a +336 de *ssrAB*, pero no a los otros fragmentos de la región -302/+478 (Figuras 36A y E), ni al control negativo (Figura 36F). Considerando que los extremos de los fragmentos +478B y +478D se superponen a los extremos de los fragmentos +478A y +478E

respectivamente, a los cuales MBP-HiID no se unió, estos resultados podrían indicar que HiID se une a la región que comprende las posiciones -111 y +307 de *ssrAB* (Figura 38).

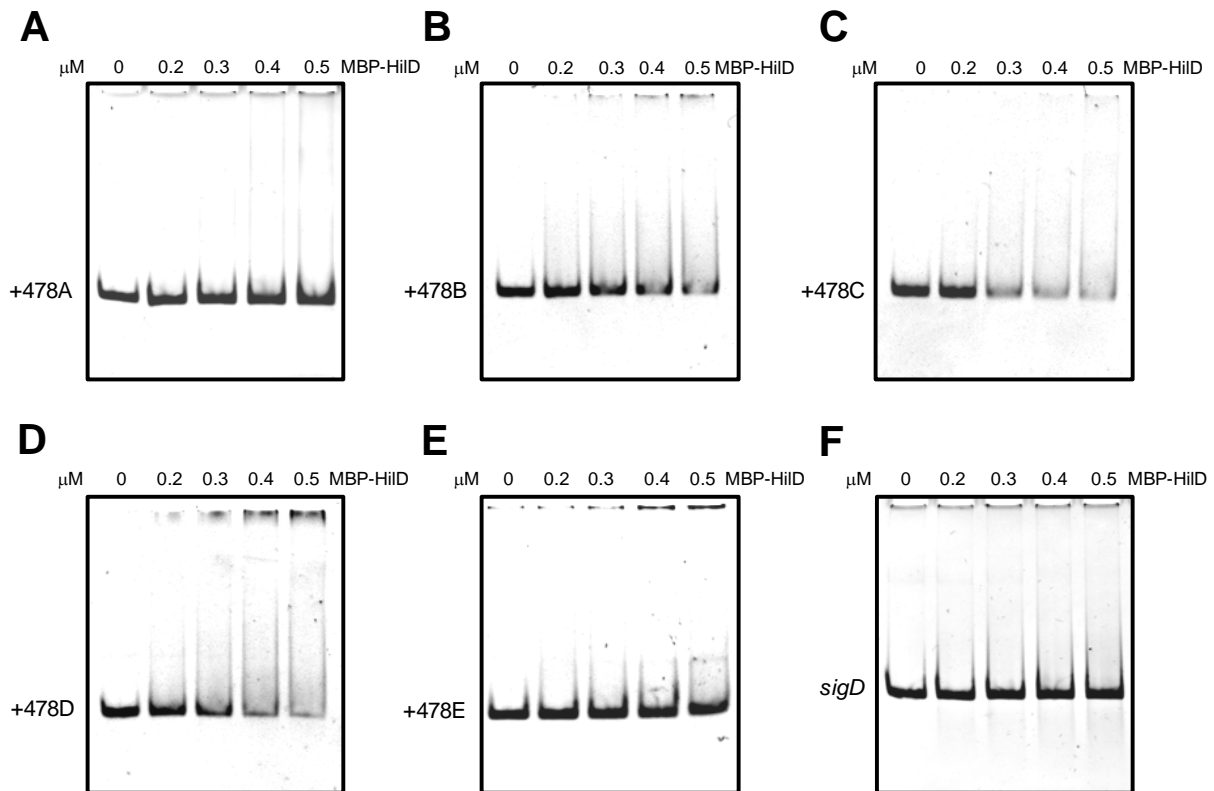


Figura 36. Ensayos de retardamiento tipo EMSA con la proteína MBP-HiID y los fragmentos de ADN 478A-478E de *ssrAB*. Los fragmentos de DNA que contienen las diferentes regiones de *ssrAB* fueron incubados con concentraciones crecientes de la proteína MBP-HiID purificada. Como control negativo se incluyó en cada reacción a *sigD*, gen cuya regulación no depende de HiID. Las concentraciones micromolares de la proteína MBP-HiID empleadas se indican arriba de cada línea. Los complejos DNA-proteína fueron visualizados en geles de acrilamida al 6% mediante tinción con bromuro de etidio.

Posteriormente se realizaron experimentos similares tipo EMSA usando a la proteína H-NS-His purificada y los mismos fragmentos de *ssrAB*. H-NS-His también se unió de manera específica a los fragmentos +478B, +478C y +478D (Figuras 37B, C y D), pero no a los fragmentos +478A y +478E (Figura 37A y E). Estos resultados indican que H-NS se une a sitios múltiples en una región amplia de *ssrAB*, lo cual es consistente con los resultados obtenidos del análisis genético que se muestra en la figura 33. Considerando la sobreposición que hay entre los fragmentos +478A y +478B y entre los fragmentos +478D y +478E, estos resultados podrían indicar que los sitios de unión de H-NS también están contenidos en la región -111/+307 (Figura 38).

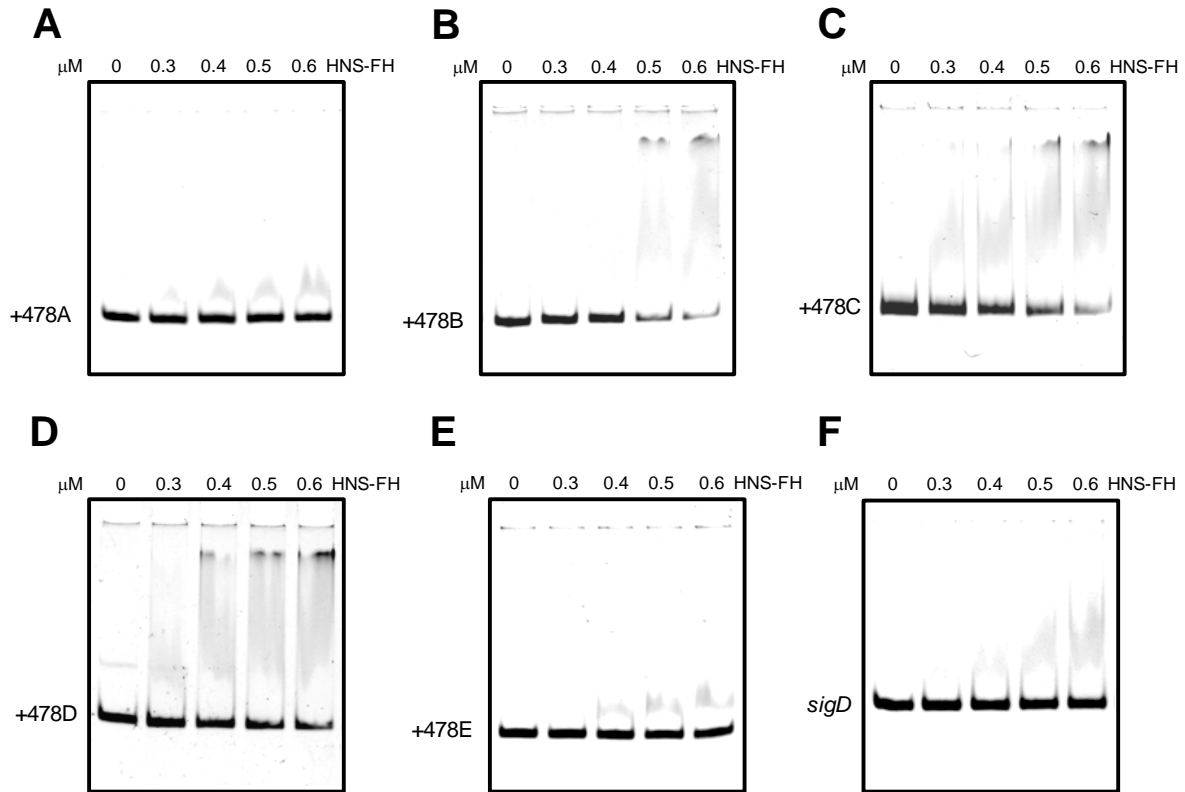


Figura 37. Ensayos de retardamiento tipo EMSA con la proteína H-NS-His y los fragmentos de ADN 478A-478E de *ssrAB*. Los fragmentos de DNA que contienen las diferentes regiones de *ssrAB* fueron incubados con concentraciones crecientes de la proteína H-NS-His purificada. Como control negativo se incluyó en cada reacción un fragmento de la región reguladora de *sigD*, gen cuya regulación no depende de H-NS. Las concentraciones micromolares de la proteína H-NS empleadas se indican arriba de cada línea. Los complejos DNA-proteína fueron visualizados en gels de acrilamida al 6% mediante tinción con bromuro de etidio.

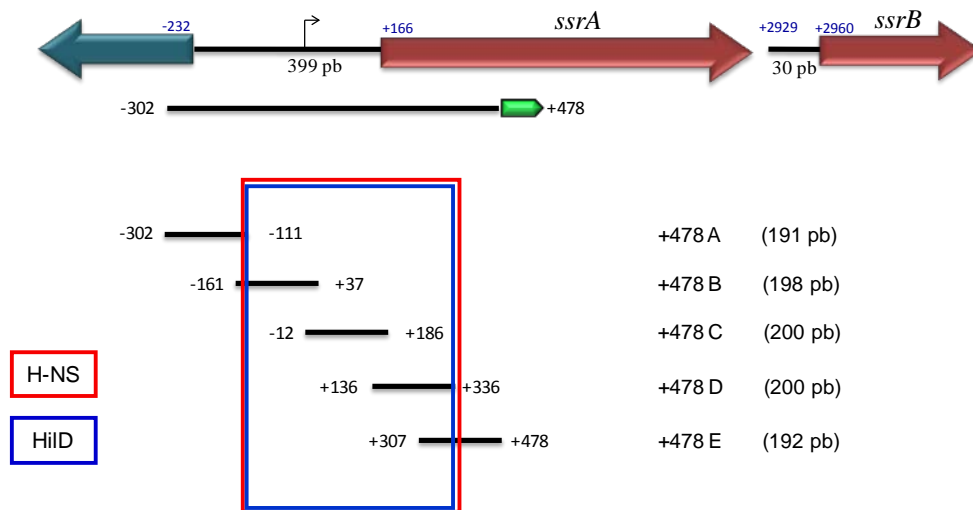


Figura 38. Representación esquemática de las regiones requeridas para la interacción de HiID y H-NS sobre *ssrAB*. De acuerdo a los ensayos de retardamiento, HiID y H-NS se unen a la región comprendida entre las posiciones -111 a +307. Se indica la región contenida en la fusión +478 completa, así como el mapa del operón *ssrAB*.

6. DISCUSIÓN

En los últimos años ha sido más evidente que los mecanismos que regulan la expresión de los genes de virulencia en *Salmonella* son más complejos de lo que anteriormente se consideraba. Actualmente se sabe que son muchos los reguladores y señales ambientales que forman parte de los mecanismos moleculares que controlan la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, los cuales determinan en gran medida la virulencia de *Salmonella* (Altier, 2005; Jones, 2005; Ellermeier y Slauch, 2007; Fass y Groisman, 2009).

Con los resultados reportados en estudios previos (Johnston *et al.*, 1996; Ahmer *et al.*, 1999; Goodier y Ahmer, 2001; Altier *et al.*, 2000a; 2000b; Lawhon *et al.*, 2003; Teplitski *et al.*, 2003; Fortune *et al.*, 2006; Teplitski *et al.*, 2006) y la información generada en este trabajo, integramos una cascada reguladora que controla la expresión de los genes de virulencia de SPI-1 y SPI-2, vía los sistemas globales BarA/SirA y Csr y el regulador específico de *Salmonella*, HilD (Figura 39).

Primeramente demostramos que SirA controla positivamente la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 a través de HilD. Teplitski *et al.*, reportó que la proteína SirA-His₆ se unía a una región localizada corriente abajo del promotor de *hilA* y a la región reguladora de *hilC* (Teplitski *et al.*, 2003), lo cual sugería que SirA regulaba directamente estos genes de SPI-1. En contraste, nosotros mostramos que la proteína de fusión MBP-SirA se une específicamente a las regiones reguladoras de *csrB* y *csrC*, pero no a las de *hilA*, *hilC* o *hilD*, a pesar de analizar los mismos fragmentos de DNA de estos genes que se usaron en el estudio de Teplitski *et al.* (Figuras 10, 12, 13 y 14). Las diferencias entre estos resultados podrían ser debidas a las diferentes especificidades para unirse al ADN entre las proteínas SirA-His₆ y MBP-SirA, o debidas a otras cuestiones técnicas. Sin embargo, todas las evidencias bioquímicas y genéticas presentadas en este trabajo apoyan la noción de que SirA activa la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 a través de HilD. Brevemente, demostramos que SirA no puede activar la expresión de *SsrB* y *HilA* en ausencia de HilD (Figuras 7 y 8), lo cual concuerda con resultados de otro estudio previo (Ellermeier *et al.*, 2005). En contraste, HilD activa la expresión de *ssrAB* y *hilA* en ausencia de SirA, indicando que HilD no requiere la presencia de SirA para activar

directamente la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2. En apoyo a estos resultados, se han desarrollado modelos matemáticos que consideran que SirA regula los genes de SPI-1 a través de HilD y dichos modelos son capaces de predecir resultados comparables con nuestros datos experimentales. Sin embargo, cuando dichos modelos consideran la regulación directa de SirA sobre *hilA* o *hilC*, no son capaces de predecir el nivel de participación de los reguladores intermediarios en la cascada reguladora que controla a los genes de SPI-1 (Ganesh *et al.*, 2009). Además, CsrB fue capaz de restaurar la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 en ausencia de SirA, pero no en ausencia de HilD (Figura 17), indicando que SirA actúa a través de CsrB para regular a estos genes, y que HilD está debajo de SirA y CsrB en la cascada reguladora que controla su expresión. Esto es consistente con previos estudios que indican que los ortólogos de SirA regulan la expresión de genes a través de los ortólogos de CsrB y CsrC (Babitzke y Romeo, 2007; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008; Brencic *et al.*, 2009; Timmermans y Van Melderen, 2010). A este respecto, nosotros demostramos que SirA se une específicamente a la región reguladora de *csrC* (Figuras 13 y 14), hecho que hasta ahora sólo había sido demostrado para *csrB* (Teplitski *et al.*, 2003; Teplitski *et al.*, 2006). Además, demostramos que CsrA se une a la secuencia Shine-Dalgarno (SD) y al codón de inicio de la traducción del ARNm de *hilD*, pero no al ARNm de *hilA* (Figura 20), lo cual correlaciona fuertemente con los datos genéticos y bioquímicos que indican que la regulación de SPI-1 y SPI-2 requiere la activación directa de *csrB* y *csrC* por SirA, lo que a su vez elimina la represión de la síntesis de HilD mediada por CsrA. Por lo tanto, HilD es responsable de la activación directa de *hilA* y *ssrAB* y así, de manera indirecta, de la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2.

Adicionalmente, encontramos que CsrA se une al ARNm de *ssrAB*, pero con una afinidad mucho más baja que la observada para el ARNm de *hilD* (Kd = 340 nM vs 5 nM) (Figura 20). Queda por esclarecer si esta interacción débil de CsrA hacia el ARNm de *ssrAB* es capaz de regular la expresión de *ssrAB*. Sin embargo, como la expresión de *ssrAB* requiere de HilD cuando *Salmonella* crece en el medio LB, la regulación de la síntesis de HilD mediada por CsrA parece ser el mecanismo primario por el cual CsrA controla la expresión de *ssrAB*. Además, la expresión de SPI-2 no se afectó significativamente en una mutante Δ *sirA* crecida en el medio mínimo MM-N (Martínez *et al.*, 2011), lo cual favorece la activación de *ssrAB* independiente de HilD.

En la figura 39 se esquematiza el modelo de la cascada reguladora que controla la expresión de SPI-1 y SPI-2, en el cual se resumen nuestros resultados y aquellos obtenidos por otros grupos de investigación.

Esta cascada reguladora se encuentra bajo la influencia de la represión catabólica a través del control positivo que ejerce la proteína receptora de AMPc, CRP, sobre la expresión de SirA (Teplitski *et al.*, 2006). La cascada reguladora también puede ser activada por ácidos grasos de cadena corta, tales como acetato, formato y propionato, los cuales estimulan a la cinasa sensora BarA y por lo tanto la fosforilación de los ortólogos de SirA (Chavez *et al.*, 2010). Alternativamente, el acetil fosfato parece fosforilar directamente al regulador de respuesta SirA o a la cinasa sensora (Altier *et al.*, 2000b; Lawhon *et al.*, 2002; Teplitski *et al.*, 2003; Teplitski *et al.*, 2006). El acetil fosfato puede generarse a partir del acetato, el cual se encuentra comúnmente en el íleon distal del intestino de los mamíferos. Dentro de la bacteria, el acetato es convertido a acetil fosfato por la acetato cinasa (*ackA*) y presumiblemente, puede ser producido endógenamente a partir de la acetil-CoA por una fosfotransacetilasa (*pta*) (Lawhon *et al.*, 2002; Teplitski *et al.*, 2006). Una vez fosforilada, SirA activa la expresión de CsrB y CsrC uniéndose a la región reguladora de *csrB* y *csrC*. Estas moléculas de ARN, a su vez, se unen a CsrA y la secuestran (Babitzke y Romeo, 2007; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008; Timmermans y Van Melderren, 2010), y así eliminan la represión traduccional que ejerce CsrA sobre *hiiD*. La apropiada concentración y actividad de HiiD es mantenida por mecanismos adicionales de regulación positiva y negativa, entre los que se encuentran la degradación de HiiD mediada por la proteasa Lon (Boddicker y Jones, 2004; Takaya *et al.*, 2005), la inactivación de HiiD por la interacción directa con HiiE (Baxter *et al.*, 2003) y la autoregulación positiva de HiiD (Olekhovich y Kadner, 2002; Ellermeier *et al.*, 2005). La cascada reguladora diverge cuando HiiD, de manera dependiente de la fase de crecimiento, activa la expresión de *hiiA* y el operón *ssrAB*, al contrarestar la represión que el regulador global H-NS ejerce sobre los promotores de estos genes (Bustamante *et al.*, 2008, Schechter *et al.*, 2003; Olekhovich y Kadner, 2006). Finalmente, HiiA y el sistema SsrA/B controlan positivamente la expresión de los regulones SPI-1 y SPI-2, respectivamente (Altier, 2005; Jones, 2005; Ellermeier y Slauch, 2007; Fass y Groisman, 2009; Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010).

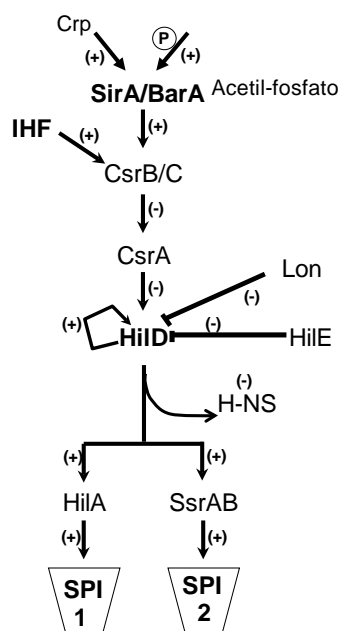


Figura 39. Representación esquemática de la cascada reguladora que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 en *S. Typhimurium*.

La cascada reguladora BarA/SirA-CsrB/C-CsrA-HilD-SPI-1/2 podría ser importante para coordinar los eventos que llevan a la infección intestinal con *Salmonella*. Diferentes líneas de evidencia apoyan la idea de que tanto los genes de SPI-1 como de SPI-2 son requeridos para la producción de enteritis en los modelos animales (Bispham *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005; Coburn *et al.*, 2005; Coombes *et al.*, 2005; Hapfelmeier *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2007; Haraga *et al.*, 2008). Aunado a esto, se ha reportado que los genes de SPI-2 se expresan en el lumen intestinal antes de que la bacteria invada el epitelio (Brown *et al.*, 2005). Además, estudios previos indican que SirA, CsrB/CsrC, CsrA y HilD son requeridos para producir los fenotipos característicos de las infecciones intestinales causadas por *Salmonella* (Jones, 2005; Altier, 2005; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008). Una vez que *Salmonella* está dentro de las células o creciendo en el medio mínimo, los genes de SPI-2, que son esenciales durante la fase sistémica de la infección (Cirillo *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 1998; Hansen-Wester y Hensel, 2001), se expresan por un mecanismo que es independiente de la cascada reguladora conformada por BarA/SirA-Csr-HilD y que involucra otros reguladores como OmpR, PhoP y SlyA (Fass y Groisman, 2009); mientras que la expresión de los genes de SPI-1 es rápidamente reprimida una vez que se da la invasión mediada por SPI-1 o cuando la bacteria crece en el medio mínimo (Eriksson *et al.*, 2003; Drecktrah *et al.*, 2006; Bustamante *et al.*, 2008). A

este respecto, se ha demostrado que la SPI-1 no es requerida para la replicación de *Salmonella* dentro de las células del hospedador (Drecktrah *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que la cascada reguladora conformada por BarA/SirA-Csr-HilD-SPI-1/2 no es funcional durante la fase sistémica de la infección. Por tanto, aunque un estudio previo reportó que SirA está involucrado en la replicación intracelular de *Salmonella* (Chan *et al.*, 2005), esto no parece estar relacionado con el papel que juega SirA en la regulación de SPI-2, sino de otros genes, de acuerdo con su papel de regulador global en *Salmonella* y otras bacterias (Ahmer *et al.*, 1999, Goodier y Ahmer, 2001).

Para definir con más detalle esta cascada de regulación, en este proyecto comenzamos a estudiar más a fondo el mecanismo por el cual SirA induce la expresión del gen *csrB*, ya que aún cuando se sabe que SirA se une a la región reguladora de este gen (Figuras 10, 12, 13 y 14; Teplitski *et al.*, 2003, Teplitski *et al.*, 2006), no se conocía la secuencia de DNA que reconoce SirA, ni tampoco si hay otros reguladores involucrados en la expresión de *csrB*.

Nuestros resultados revelaron que SirA se une como dímero a la secuencia palindrómica 5'- TGTGAGAGATCTCTTACA -3' localizada entre las posiciones -173 y -190, con respecto al inicio de la transcripción de *csrB*. Otros estudios han revelado que la secuencia 5'- TGTAAGNNATNNCTTACA -3', se conserva en las regiones reguladoras de los ortólogos de *csrB*, en *E. coli*, *Pseudomonas* sp. y *Vibrio* sp. (Heeb *et al.*, 2002; Valverde *et al.*, 2003; Kay *et al.*, 2005; Lenz *et al.*, 2005; Kulkarni *et al.*, 2006; Humair *et al.*, 2010). Sin embargo, no se había mostrado la interacción de los ortólogos de SirA con esta secuencia. Así, en este estudio mostramos claramente la función que tiene esta secuencia como sitio de reconocimiento de SirA y para la regulación de *csrB* mediada por SirA. Este conocimiento puede emplearse para comprender cómo es la regulación mediada por este sistema, en las diferentes bacterias que lo contienen.

Además, en este trabajo mostramos que IHF regula directamente, de manera positiva y en coordinación con SirA, la expresión de *csrB*. La proteína IHF se une a la secuencia 5'- AAACAATAATTAATAA -3', localizada entre el sitio de unión de SirA y el promotor de *csrB*, entre las posiciones -90 y -105, con respecto a su sitio de inicio de la transcripción. IHF es un regulador que contribuye a la organización del genoma y al control de procesos como la transcripción, replicación, recombinación sitio específica y

transposición, al inducir doblamientos en el DNA que favorecen estos procesos (Swinger y Rice, 2004).

En *E. coli*, IHF es requerido para la activación del operón *gltBDF* mediada por Lrp. El operón glutamato sintasa (*gltBDF*) participa en una de las dos vías más importantes para la asimilación de amonio en *E. coli*. IHF se une a la secuencia localizada en la posición -75/-113 del promotor de *gltBDF* mientras que existen 3 sitios que son reconocidos por Lrp en las posiciones -152, -215 y -246, con respecto al inicio de la transcripción de *gltBDF*. Una vez unidas ambas proteínas en dichas localizaciones, IHF induce un doblamiento del ADN de tal forma que Lrp puede hacer contacto con la ARN polimerasa y así asociarla al promotor e inducir la expresión de *gltBDF* (Paul *et al.*, 2007).

En *Vibrio vulnificus*, IHF media la interacción entre el regulador de “quórum sensing” SmcR y la ARN polimerasa para inducir la activación de un posible factor de virulencia, *vvpE*, que codifica una elastasa. IHF se une a la secuencia localizada en las posiciones -174 y -131 de *vvpE* e induce el doblamiento del ADN con lo que favorece el contacto entre SmcR que se une a la región -196 de *vvpE* y la ARN polimerasa (Jeong *et al.*, 2010).

En *Neisseria gonorrhoeae*, IHF está involucrado en el control del operón *farAB*, que codifica un sistema de resistencia a ácidos grasos de cadena larga antimicrobianos. Este sistema es reprimido por el regulador FarR que se une como homodímero sobre dos sitios corriente arriba del promotor del operón *farAB*. Esta represión requiere de IHF, que se une a la secuencia localizada entre los dos sitios que reconoce FarR e induce el doblamiento del ADN que favorece la unión de ambos homodímeros de FarR, creando así la estructura estable de FarR que es requerida para reprimir al operón *farAB* (Lee *et al.*, 2006).

En un estudio previo en *Pseudomonas fluorescens*, el cual tiene a los sistemas GacS/GacA y RsmX/Y/Z, ortólogos de los sistemas BarA/SirA y CsrB/C de *Salmonella*, respectivamente, de *Salmonella*, se determinó que IHF es capaz de unirse al promotor de *rsmZ*, aunque en este estudio no se determinó si IHF está involucrado en la expresión de este gen (Humair *et al.*, 2010).

Nuestros resultados indican con claridad que *csrB* se regula positivamente por la acción concertada directa de SirA e IHF.

Con base en nuestros resultados y en los antecedentes acerca del papel que tiene IHF en la regulación de la expresión genética, proponemos que el papel de IHF sería el de

inducir un doblamiento en el DNA, que favorezca la formación del complejo SirA-ARNpol-promotor, lo cual induce la transcripción de *csrB* (Figura 40).

Estos resultados nos han permitido integrar a IHF como un regulador más en la compleja cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 (Figura 39). Así mismo, generan datos útiles para ampliar el conocimiento que se tiene sobre el mecanismo por el que IHF actúa como regulador en diversos genes de diferentes microorganismos. Además, como se ha mencionado anteriormente, existen ortólogos de los sistemas BarA/SirA y Csr en diferentes bacterias, por lo que nuestros datos también generan información útil que puede traspolarse para comprender cómo es la regulación del sistema Csr mediada por SirA en los diferentes microorganismos que poseen estos sistemas y en los que son importantes para controlar la expresión de genes asociados con virulencia, metabolismo secundario, motilidad, producción de exoenzimas, “quórum sensing” o formación de biopelículas (Goodier and Ahmer, 2001; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008).

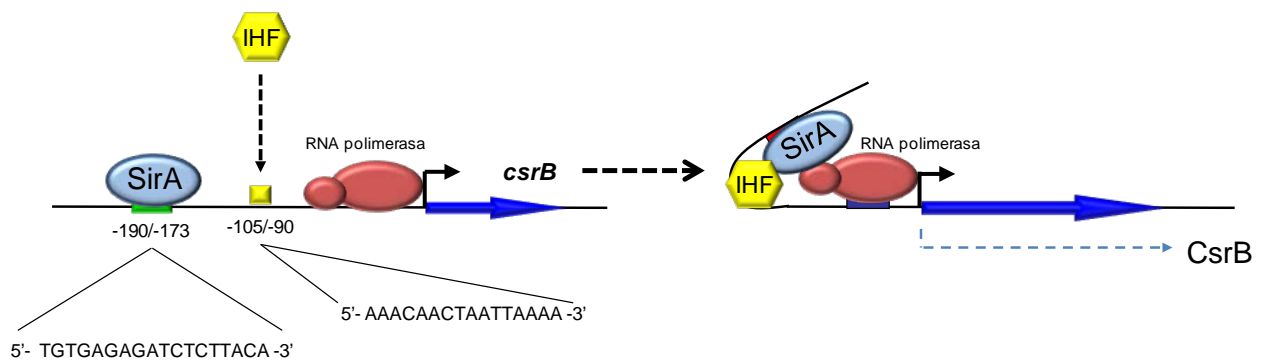


Figura 40. Modelo propuesto para la regulación de *csrB* por SirA e IHF. SirA reconoce la secuencia palindrómica 5'- TGTGAGAGATCTCTTACA -3' localizada entre las posiciones -173 y -190, con respecto al inicio de la transcripción de *csrB*, mientras que IHF reconoce la secuencia 5'- AAACAAC TAATTAAAA -3' localizada entre el sitio de unión de SirA y el promotor de *csrB*, entre las posiciones -90 y -105. IHF se une en *csrB*, probablemente induciendo un doblamiento en el DNA que posiciona a una distancia y orientación adecuada a SirA para que pueda favorecer la interacción de la RNA polimerasa al promotor.

Por otro lado, en este trabajo localizamos algunas secuencias reguladoras que actúan en *cis* para la regulación de *ssrAB*, y así de los genes de SPI-2, mediada por HilD, H-NS y OmpR (Figura 41).

En resumen, la región +10/+478, localizada corriente abajo del promotor de *ssrAB* se requiere para su regulación mediada por HilD y H-NS. Esta región contiene secuencias de control negativo, que al irse eliminando gradualmente, provocan que la expresión de

ssrAB se vaya haciendo independiente de HilD. Ambos, HilD y H-NS interactúan con la región +10/+478. Esto es consistente con nuestros resultados previos que sugieren que HilD actúa como un anti-represor de H-NS para inducir la expresión de *ssrAB* (Bustamante *et al.*, 2008). Es decir, en ausencia de H-NS o de las posibles secuencias a las que se une H-NS, ya no se requiere a HilD para la expresión de *ssrAB*.

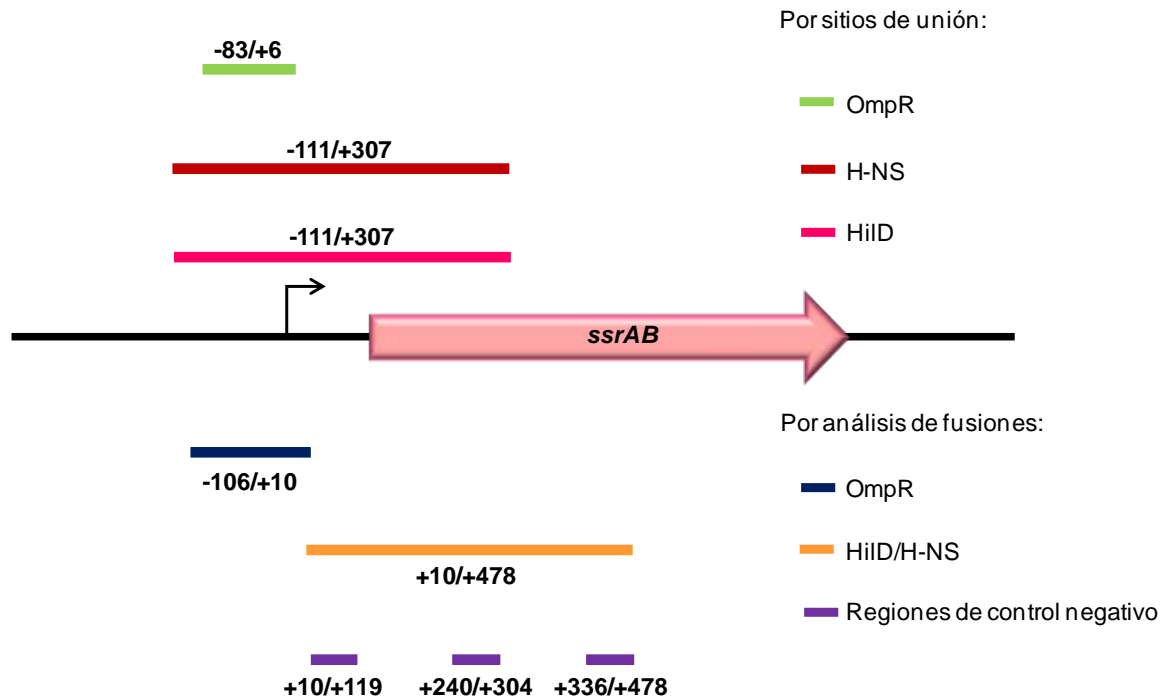


Figura 41. Esquema que muestra las regiones de *ssrAB* necesarias para su regulación mediada por HilD, OmpR y H-NS. Mediante EMSAs hemos determinado que HilD y H-NS se unen específicamente a la región -111/-307, con respecto al inicio de la transcripción de *ssrAB*. En estudios previos se reportó que OmpR se une a la región -83/+6 (Lee *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2003). El análisis de la expresión de las fusiones *ssrAB-cat* (que contienen diferentes segmentos de la región reguladora de *ssrAB*) reveló que la región +10/+478 se requiere para la regulación de *ssrAB* mediada por HilD y H-NS, mientras que la región -106/+10 se requiere para su regulación mediada por OmpR. Así mismo, este análisis reveló la existencia de tres regiones de control negativo, +10/+119, +240/+304 y +336/+478, localizadas corriente abajo del promotor de *ssrAB*. Además, este análisis mostró que la secuencia corriente arriba de la posición -106 de *ssrAB* no es necesaria para su regulación mediada por HilD, H-NS y OmpR.

H-NS es una de las proteínas asociadas al nucleóide, cuya función es estructurar al DNA y juegan un papel muy importante en la regulación de la expresión génica (Dillon y Dorman, 2010). Se han reportado dos mecanismos por los cuales H-NS es capaz de unirse al DNA y reprimir la expresión de sus genes blanco (Dorman, 2007). El primero se da cuando H-NS se une a secuencias de DNA localizadas corriente arriba y corriente abajo del promotor, lo cual lleva a la formación de una horquilla, estabilizada por la

oligomerización de H-NS, impidiendo así el acceso de la ARN polimerasa a los promotores, o atrapando a la ARN polimerasa unida a los promotores. El segundo mecanismo se da cuando H-NS interactúa inicialmente con algunos sitios cercanos a los promotores, lo cual permite su polimerización para formar un filamento a lo largo del DNA que impide el acceso de la ARN polimerasa a los promotores (Dorman, 2007). Nuestros resultados sugieren que H-NS requiere de sitios múltiples localizados corriente abajo del promotor para reprimir la expresión de *ssrAB*, pero no se requiere de la secuencia localizada corriente arriba de este promotor para dicha represión. Así, nuestros resultados podrían favorecer el modelo de formación de filamento de H-NS para la represión de *ssrAB*.

Nuestros resultados también mostraron que la región -106/+10 es suficiente para la regulación positiva de *ssrAB* mediada por OmpR. Es decir, aún en ausencia de H-NS (Bustamante *et al.*, 2008) o de la región +10/+478, que media la represión de *ssrAB* por H-NS, se necesita a OmpR para la expresión de este operón, sugiriendo que OmpR actúa como un activador clásico y no un anti-represor como HilD. Estudios previos han mostrado que OmpR se une a la región -106/+10 de *ssrAB* (Lee *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2003).

Con base en nuestros resultados y los resultados generados en estudios previos, proponemos que cuando *Salmonella* crece en condiciones específicas, como el crecimiento en LB, la expresión de *ssrAB* se induce mediante la acción concertada de HilD y OmpR. Ya que la expresión de H-NS es constitutiva (Dillon y Dorman, 2010), el estado basal de *ssrAB* sería de represión. H-NS reprime a *ssrAB* al unirse a diferentes sitios localizados corriente abajo de su promotor, en la región +10/+478, probablemente mediante la formación de un filamento de H-NS sobre el DNA. Cuando se expresa HilD, mediante la cascada de regulación BarA/SirA/IHF-CsrB/C que describimos en este trabajo, éste se une a la misma región que H-NS, lo cual desestabilizaría el complejo represor formado por H-NS, probablemente desplazando a H-NS de sus sitios de interacción, como lo hacen otros reguladores que actúan como anti-represores de H-NS en otros genes (Stoebel *et al.*, 2008). Sin embargo, esto no es suficiente para que se induzca la expresión de *ssrAB*. Se requiere que OmpR se una a la región -106/+10, para así favorecer la interacción de la ARN polimerasa con el promotor de *ssrAB*. OmpR podría actuar en *ssrAB* como otros reguladores que se unen a la secuencia localizada entre las

regiones -35 y -10 de los promotores, favoreciendo la orientación espacial adecuada de estas regiones para que sean reconocidas de manera eficiente por la ARN polimerasa (Browning y Busby, 2004).

Nuestros resultados amplían, de manera importante, el conocimiento actual acerca de los mecanismos moleculares que coordinan la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 de *Salmonella*. Específicamente, integramos con claridad la cascada de regulación formada por los sistemas globales BarA/SirA y Csr, que inducen la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2 a través del regulador HilD, codificado en SPI-1. Así mismo, definimos con mayor detalle el mecanismo de regulación de *csrB* por SirA e IHF, integrando así a IHF como un regulador más de la cascada de regulación que controla la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2. Además, definimos elementos importantes para la regulación de *ssrAB* mediada por HilD y OmpR. Así, nuestros resultados pueden ayudar a entender cómo funcionan los sistemas ortólogos de BarA/SirA y CsrB/C en otras bacterias, donde controlan genes asociados a virulencia, metabolismo, movilidad y formación de biopelículas.

Por otro lado, nuestros resultados, junto con los resultados generados en estudios previos, ilustran cómo múltiples reguladores globales y específicos han sido integrados durante la evolución de *Salmonella* para formar una compleja red de regulación, que controla la apropiada expresión espacio-temporal de los genes que han sido adquiridos por eventos de transferencia horizontal. Esto le permite a *Salmonella* definir el nicho específico donde se habrá de establecer una infección exitosa en sus hospedadores.

El conocimiento generado en este trabajo ayudará a entender mejor los mecanismos que reprograman la expresión genética en *Salmonella*, para pasar de ser un patógeno extracelular invasivo a ser un patógeno que sobrevive en macrófagos en un ambiente intracelular.

7. PERSPECTIVAS

- Definir el papel de otros reguladores que tengan efecto sobre la expresión de los reguladores centrales de las SPIs, *hilA* y *ssrAB*, con el fin de analizar si el papel reportado es directo sobre estos genes, o tal como hemos visto nosotros, es indirecto a través de actuar en algún nivel de la cascada reguladora que nosotros reportamos.
- Definir dominios funcionales en las proteínas reguladoras involucradas en la cascada de regulación que reportamos; por ejemplo, dominios de interacción con el ADN o con proteínas, así como dominios de detección de señales.
- Definir en qué nivel de la cascada serían detectadas la señales que inducen la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2.
- Definir el mecanismo de regulación de *csrC* mediado por SirA.
- Definir las secuencias específicas que reconocen HilD y H-NS en la región reguladora de *ssrAB*. Generar una cepa mutante de *S. Typhimurium* en la cual se bloquee la inducción de la expresión de los genes de SPI-2 mediada por HilD, al mutar la secuencia de reconocimiento de HilD en *ssrAB*. Analizar en diferentes modelos animales y cultivos de células las propiedades de virulencia de esta cepa mutante, para determinar en que etapa de la patogénesis de *Salmonella* es importante la regulación de los genes de SPI-2 mediada por HilD.
- Monitorear la expresión *in vivo* de los genes que conforman la cascada de regulación en el modelo de infección murino mediante fusiones transcripcionales al gen reportero *lux*.

8. REFERENCIAS

Ahmer BM, Gunn JS. Interaction of *Salmonella* spp. with the intestinal microbiota. *Front Microbiol* 2011;2:101.

Ahmer BMM, Reeuwijk J, Watson PR, Wallis TS, Hefron F. *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Mol Microbiol* 1999;31:971-982.

Akbar S, Schechter LM, Lostroh CP, Lee CA. AraC/XylS family members, HilD and HilC, directly activate virulence gene expression independently of HilA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 2003;47:715-728.

Altier C, Suyemoto M, Ruiz AI, Burnham KD, Maurer R. Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Mol Microbiol* 2000a;35:635-646.

Altier C, Suyemoto M, Lawhon S. Regulation of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium invasion genes by CsrA. *Infect Immun* 2000b;68:6790-6797.

Altier C. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* 2005;43: 85-92.

Arai T, Hiromatsu K, Nishimura H, Kimura Y, Kobayashi N, Ishida H, Nimura Y, Yoshikai Y. Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during *Salmonella* infection. *Bioch Biophys Res Commun* 1995;213:600-607.

Babitzke P, Romeo T. CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol* 2007;10:156-163.

Bader MW, Navarre WW, Shiau W, Nikaido H, Frye JG, McClelland M, Fang FC, Miller SI. Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. *Mol Microbiol* 2003;50:219-230.

Baek CH, Wang S, Roland KL, Curtiss R 3rd. Leucine-responsive regulatory protein (Lrp) acts as a virulence repressor in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2009;191:1278-92.

Bajaj V, Hwang C, Lee CA. HilA is a novel OmpR/ToxR family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol Microbiol* 1995;18:715-727.

Bajaj V, Lucas RL, Hwang C, Lee CA. Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by control of *hilA* expresión. *Mol Microbiol* 1996;22:703-714.

Baker CS, Eory LA, Yakhnin H, Mercante J, Romeo T y Babitzke P. CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli hfq* by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence. *J Bacteriol* 2007;189:5472-5481.

Bakshi CS, Singh VP, Wood MW, Jones PW, Wallis TS, Gallyov EE. Identification of SopE2, a *Salmonella* secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells. *J Bacteriol* 2000;182:2341-2344.

Barba J, Bustamante VH, Flores-Valdez MA, Deng W, Finlay BB, Puente JL. A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J Bacteriol* 2005;187:7918-30.

Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martínez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M, Pfeffer K, Rüssmann H, Hardt WD. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun* 2003;71:2839-58.

Bäumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1996;64:1862-1865

Baxter MA, Fahlen TF, Wilson RL, Jones BD. HilE interacts with HilD and negatively regulates *hila* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect Immun* 2003;71:1295-1305.

Bayoumi MA, Griffiths MW. Probiotics down-regulate genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium pathogenicity islands 1 and 2. *J Food Prot* 2010;73:452-60.

Behlau I, Miller SI. A PhoP-repressed gene promotes *Salmonella typhimurium* invasión of epithelial cells. *J Bacteriol* 1993;175:4475-4484.

Beuzon CR, Meresse S, Unsworth KE, Ruiz-Albert J, Garvis S, Waterman SR, Ryder TA, Boucrot E, Holden DW. *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *EMBO J* 2000;19:3235-3249.

Bevilacqua JM, Bevilacqua PC. Thermodynamic analysis of an RNA combinatorial library contained in a short hairpin. *Biochemistry* 1998;37:15877-15884.

Bhan MK, Bahl R, Bhatnagar S. Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet* 2005;366:749-62.

Bijlsma JJE y Groisman EA. The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 2005;57:85-96.

Bispham J, Tripathi BN, Watson PR, Wallis TS. *Salmonella* pathogenicity island 2 influences both systemic salmonellosis and *Salmonella*-induced enteritis in calves. *Infect Immun* 2001;69: 367-377.

Blocker A, Komoriya K, Aizawa SI. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3027-3030.

Boddicker JD, Knosp BM, Jones BD. Transcription of the *Salmonella* invasión gene activator, *hila*, requires HilD activation in the absence of negative regulators. *J Bacteriol* 2003;185:525-533.

Boddicker JD, Jones BD. Lon protease activity causes down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells. *Infect Immun* 2004;72:2002-2013.

Bowe F, Lipps CJ, Tsolis RM, Groisman E, Heffron F, Kusters JG. At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection of mice. *Infect Immun* 1998;66:3372-3377.

Boyen F, Haesebrouck F, Vanparys A, Volf J, Mahu M, Van Immerseel F, Rychlik I, Dewulf J, Ducatelle R, Pasmans F. Coated fatty acids alter virulence properties of *Salmonella Typhimurium* and decrease intestinal colonization of pigs. *Vet Microbiol* 2008;132:319-27.

Bowe F, Lipps CJ, Tsolis RM, Groisman E, Heffron F, Kusters JG. At least four percent of the *Salmonella typhimurium* genome is required for fatal infection in mouse. *Infect Immun* 1998;66:3372-3377.

Brencic A, McFarland KA, McManus HR, Castang S, Mogno I, Dove SL, Lory S. The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol Microbiol* 2009;73:434-445.

Brosius J. Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene* 1984;27:151-160.

Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* Nomenclature. *J Clin Microbiol* 2000;38: 2465–2467.

Brown NF, Vayanse BA, Coombes BK, Valdez Y, Coburn BA, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS pathogens* 2005;252-258.

Browning DF, Busby SJW. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature* 2004;2:1-9.

Bustamante VH, Martinez LC, Santana FJ, Knodler LA, Steele-Mortimer O, Puente JL. HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:14591-14596.

Casadaban MJ. Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* 1976;104:541-555.

Catron DM, Silvestre MD, Lange Y, Kadekoppia M, Jones BD, Monack DM. The *Salmonella*-containing vacuole is a major site of intracellular cholesterol accumulation and recruits the GPI-anchored protein CD55. *Cell Microbiol* 2002;4:315-328.

Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. 2011. www.cenavece.salud.gob.mx

Chakravorty D, Hanse-Wester I, Hensel M. *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J Exp Med* 2002;195:1155-1166.

Chan K, Kim CC, Falkow S. Microarray-based detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transposon mutants that cannot survive in macrophages and mice. *Infect Immun* 2005;73:5438-5449.

Chavez RG, Alvarez AF, Romeo T, Georgellis DT. The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J Bacteriol* 2010;192: 2009-2012.

Cherepanov PP, Wackerangel W. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 1995;158:9-14.

Choi J, Shin D, Yoon H, Kim J, Lee CR, Kim M, Seok YJ, Ryu S. *Salmonella* pathogenicity island 2 expression negatively controlled by EIIANtr-SsrB interaction is required for *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:20506-11.

Chubiz JEC, Golubeva YA, Lin D, Miller LD, Slauch JM. FliZ Regulates Expression of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Invasion Locus by Controlling HilD Protein Activity in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2010;192: 6261–6270.

Cirillo DM, Valdivia RH, Monack DM, Falkow S. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* 1998;30:175-188.

Coburn B, Li Y, Owen D, Vallance BA, Finlay BB. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* 2005;73:3219-3227.

Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol* 2001;9:113-114.

Coombes BK, Brown NF, Valdez Y, Brumell JH, Finlay BB. Expression and secretion of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL. *J Biol Chem* 2004;279:49804-49815.

Coombes BK, Coburn BA, Potter AA, Gomis S, Mirakhur K, Li Y, Finlay BB. 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* 2005a;73:7161-9.

Coombes BK, Wickham ME, Lowden MJ, Brown NF, Finlay BB. Negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 is required for contextual control of virulence during typhoid. *Proc Natl Acad Sci* 2005b;102:17460-17465.

Criss AK, Casanova JE. Coordinate regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion of epithelial cells by the Arp2/3 complex and Rho GTPases. *Infect Immun* 2003;71:2885-91.

Daines DA, Silver RP. Evidence for multimerization of Neu proteins involved in polysialic acid synthesis in *Escherichia coli* K1 using improved LexA-based vectors. *J Bacteriol* 2000;182:5267-5270.

Darwin KH, Miller VL. InvF is required for expresión of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1999;181:4949-4954.

Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:6640-6645.

De Keersmaecker SCJ, Marchal K, Verhoeven TLA, Engelen K, Vanderleyden J, Detweiler CS. Microarray analysis and motif detection reveal new targets of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulatory protein, including *hilA* itself. *J Bacteriol* 2005;187:4381-4391.

Deiwick J, Nikolaus T, Erdogan S, Hensel M. Environmental regulation of *Salmonella* Pathogenicity island 2 gene expresión. *Mol Microbol* 1999;31:1759-1764.

Dillon SC, Dorman CJ. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nature* 2010;8:185-195.

Dmitrova M, Younes-Cauet G, Oertel-Buchheit P, Porte D, Schnarr M, Granger-Schnarr M. A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 1998;257:205-212.

Dorman CJ, Deighan P. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:179-184.

Dorman CJ. Probing bacterial nucleoid structure with optical tweezers. *Bioessays* 2007;29:212-216.

Drecktrah D, Knodler LA, Ireland R, Steele-Mortimer O. The mechanism of *Salmonella* entry determines the vacuolar environment and intracellular gene expression. *Traffic* 2006;7:39-51.

Dubey AK, Baker CS, Romeo T, Babitzke P. RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA* 2005;11:1579-1587.

Durant JA, Corrier DE, Ricke SC. Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of the *hilA* and *invF* genes of *Salmonella typhimurium*. *J Food Prot* 2000;63:573-578.

Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 1993;61:4569-4574.

Eichelberg K, Galán JE. Differential regulation of *Salmonella typhimurium* type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1) encoded transcriptional activators *invF* y *hilA*. *Infect Immun* 1999;67:4099-4105.

Ellermeier CD, Slauch JM. RtsA and RtsB coordinately regulate expression of the invasion and flagellar genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2003;185:5096-5108.

Ellermeier CD, Ellermeier JR, Slauch JM. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 2005;57:691-705.

Ellermeier JR, Slauch JM. Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol* 2007;10:24-29.

Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M, Hinton JCD. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 2003;47:103-118.

Fahlen TF, Mathur N, Jones BD. Identification and characterization of mutants with increased expression of *hilA*, the invasion gene transcriptional activator of *Salmonella typhimurium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;28:25-35.

Fahlen TF, Wilson RL, Boddicker JD, Jones BD. Hha is a negative modulator of transcription of *hilA*, the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion gene transcriptional activator. *J Bacteriol* 2001;183:6620-6629.

Fass E, Groisman EA. Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol* 2009;12:199-204.

Feng Y, Wente SR, Majerus PW. Overexpression of the inositol phosphatase SopB in human 293 cells stimulates cellular chloride influx and inhibits nuclear mRNA export. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:875-879.

Feng X, Oropeza R, Kenney LJ. Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* p<athogenicity island 2. *Mol Microbiol.* 2003 May;48:1131-43.

Feng X, Walthers D, Oropeza R, Kenney LJ. The response regulator SsrB activates transcription and binds to a region overlapping OmpR binding sites at *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol.* 2004 Nov;54:823-35.

Fortune DR, Suyemoto M, Altier C. Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 2006;74:331-339.

Francis CL, Ryan TA, Jones BD, Smith SJ, Falkow S. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* 1993;364:639-642.

Freeman JA, Rappl C, Kuhle V, Hensel M, Miller SI. SpiC is required for translocation of *Salmonella* pathogenicity island 2 effectors and secretion of translocon proteins SseB and SseC. *J Bacteriol* 2002;184:4971-4980.

Friebel A, Ilchmann H, Aepfelbacher M, Ehrbar K, Machleidt W, Hardt WD. SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of Rho GTPases of the host cell. *J Biol Chem* 2001;36:34035-34040.

Frost AJ, Bland AP, Wallis TS. The early dynamic response of the calf ileal epithelium to *Salmonella typhimurium*. *Vet Pathol* 1997;34:369-386.

Fu Y, Galán JE. The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* 1998;27:359-368.

Galán JE, Curtís RD. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6383-6387.

Galyov EE, Wood MW, Rosqvist R, Mullan PB, Watson PR, Hedges S, Wallis TS. A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol Microbiol* 1997;25:903-912.

Ganesh AB, Rajasingh H, Mande SS. Mathematical modeling of regulation of type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by SirA. *In Silico Biol* 2009;9:S57-72.

Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, Hinton JC, Van Immerseel F. Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:946-9.

García-del Portillo F. *Salmonella* intracellular proliferation: where, when and how? *Microbes Infect* 2001;3:1305-1311.

Garcia-Vescovi E, Soncini FC, Groisman EA. Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* 1996;84:165-174.

Garmendia J, Beuzon CR, Ruiz-Albert J, Holden DW. The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system. *Microbiology* 2003;149:2385-2396.

-
-
- Georgellis D, Arvidson S, von Gabain A.** Decay of *ompA* mRNA and processing of 9S RNA are immediately affected by shifts in growth rate, but in opposite manners. *J Bacteriol* 1992;174: 5382-5390.
- Gerken H, Charlson ES, Cicirelli EM, Kenney LJ, Misra R.** MzrA: a novel modulator of the EnvZ/OmpR two-component regulon. *Mol Microbiol.* 2009;72:1408-22.
- Gerken H Misra R.** MzrA-EnvZ interactions in the periplasm influence the EnvZ/OmpR two-component regulon. *J Bacteriol* 2010;192:6271-8.
- Ginocchio CC, Olmsted SB, Wells CL, Galán JE.** Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell* 1994;76:717-724.
- Goodier RI, Ahmer BM.** SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol* 2001;183: 2249-2258.
- Guiney DG, Lesnick M.** Targeting of the actin cytoskeleton during infection by *Salmonella* strains. *Clin Immunol.* 2005 Mar;114:248-55.
- Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC.** Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública de México* 2000;42:490-495.
- Hacker J, Kaper JB.** Pathogenicity islands and evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:641-679.
- Hansen-Wester I, Hensel M.** *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* 2001;3:549-559.
- Hapfelmeier S, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Muller AJ, Heikenwalder M.** The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar Typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* 2005;174:1675-1685.
- Haraga A, Ohlson MB, Miller SI.** *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:53-66
- Hayward RD, Koronakis V.** Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. *EMBO J* 1999;18:4926:4934.
- Heeb S, Blumer C, Haas D.** Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol* 2002;184:1046-1056.
- Hensel M, Shea JE, Waterman SR, Mundy R, Nikolaus T, Banks G, Vazquez Torres A, Gleeson C, Fang FC, Holden DW.** Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* 1998;30:163-174.
- Hensel M, Nikolaus T, Egelseer C.** Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* pathogenicity Island 2. *Mol Microbiol* 1999;31:489-498.
- Hensel M.** Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 2004;294:95-102.
- Hensel M.** *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* 2000;36:1015-1023.
-
-

-
-
- Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A.** The *Salmonella* invasion SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:2396-2401.
- Hoiseth SK, Stocker BA.** Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 1981;291:238-239.
- Huang Y, Suyemoto M, Garner CD, Cicconi KM, Altier C.** Formate Acts as a Diffusible Signal To Induce *Salmonella* Invasion. *J Bacteriol* 2008;190:4233-4241.
- Humair B, Wackwitz B, Haas D.** GacA-Controlled Activation of Promoters for Small RNA Genes in *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:1497–1506.
- Iyoda S, Kamidoi T, Hirose K, Kutsukake K, Watanabe H.** A flagellar gene *fliZ* regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog* 2001;30:81-90.
- Jeong HS, Kim SM, Lim MS, Kim KS, Choi SH.** Direct Interaction between Quorum-sensing Regulator SmcR and RNA Polymerase Is Mediated by Integration Host Factor to Activate *vvpE* Encoding Elastase in *Vibrio vulnificus*. *J Biol Chem* 2010;285:9357-9366.
- Johnston C, Pegues DA, Hueck CJ, Lee A, Miller SI.** Transcriptional activation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator super family. *Mol Microbiol* 1996;22:715-727.
- Jones BD, Lee CA, Falkow S.** Invasion by *Salmonella typhimurium* is affected by the direction of flagellar rotation. *Infect Immun* 1992;60:2475-80.
- Jones BD, Falkow S.** Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol* 1996;14:533-61.
- Jones BD.** *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *J Microbiol* 2005;43:110-117.
- Jones MA, Hulme SD, Barrow PA, Wigley, P.** The *Salmonella* pathogenicity island 1 and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken. *Avian Pathol* 2007;36:199-203.
- Kage H, Takaya A, Ohya M., Yamamoto T.** Coordinated regulation of expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 and flagellar type III secretion systems by ATP-dependent ClpXP protease. *J Bacteriol* 2008;190:2470-8.
- Kay E, Dubuis C, Haas D.** Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:17136–17141.
- Kenney LJ, Bauer MD, Silhavy TJ.** Phosphorylation-dependent conformational changes in OmpR, an osmoregulatory DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:8866-8870.
- Kim CC, Falkow S.** Delineation of upstream signaling events in the *Salmonella* pathogenicity island 2 transcriptional activation pathway. *J Bacteriol* 2004;186:4694-704.
-
-

Kim B, Richards SM, Gunn JS, Slauch JM. Protecting against antimicrobial effectors in the phagosome allows SodCII to contribute to virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2010;192:2140-9.

Kuhle V, Hensel M. Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2812-2826.

Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galán JE, Aizawa SI. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 1998;280:602-5.

Kulkarni PR, Cui X, Williams JW, Stevens AM, Kulkarni RV. Prediction of CsrA-regulating small RNAs in bacteria and their experimental verification in *Vibrio fischeri*. *Nucleic Acids Res* 2006; 34:3361–3369.

Lapouge KM, Schubert M, Allain FH, Haas D. Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol* 2008;67:241-253.

Lawhon SD, Maurer R, Suyemoto M, Altier C. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol* 2002;46:1451-1464.

Lawhon SD, Frye JG, Suyemoto M, Porwollik S, McClelland M, Altier C. Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 2003;48:1633-1645.

Lee CA, Falkow S. The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4304-8.

Lee AK, Detweiler CS, Falkow S. OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* 2000;182:771-781.

Lee EH, Hill SA, Napier R, Shafer WM. Integration Host Factor is required for FarR repression of the farAB-encoded efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* 2006;60:1381-400.

Lenz DH, Miller MB, Zhu J, Kulkarni RV, Bassler BL. CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 2005; 58:1186–1202.

Levine MM, Tacket CO, Sztein MB. Host-*Salmonella* interaction: human trials. *Microbes Infect* 2001;3:1271-1279.

Libby SJ, Goebel W, Ludwig A, Buchmeier N, Bowe F, Fang FC, Guiney DG, Songer JG, Heffron F. A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 1994;91:489-493.

Lim S, Kim B, Choi HS, Lee Y, Ryu S. Fis is required for proper regulation of *ssaG* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog* 2006;41:33-42.

Linehan SA, Ritkónen A, Yu XJ, Liu M, Holden DW. SlyA regulates function of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 (SPI-2) and expression of SPI-2-associated genes. *Infect Immun* 2005;73:4354-4362.

Liu MY, Romeo T. The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a specific mRNA-binding protein. *J Bacteriol* 1997;179:4639-42.

-
-
- Livak KJ, Schmittgen TD** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408.
- Löber S, Jäckel D, Kaiser N, Hensel M.** Regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes by independent environmental signals. *Int J Med Microbiol* 2006;296:435-47.
- López-Garrido J, Casadesús J.** Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by DNA adenine methylation. *Genetics* 2010;184:637-49.
- Loströh CP, Bajaj V, Lee CA.** The *cis* requirements for transcriptional activation by HilA, a virulence determinant encoded on SPI-1. *Mol Microbiol* 2000;37:300-315.
- Loströh CP, Lee CA.** The HilA box and sequences outside it determine the magnitude of HilA-dependent activation of P_{prgH} from *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol* 2001a;183:4876-48858.
- Loströh CP, Lee CA.** The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect* 2001b;3:1281-1291.
- Lucas RL, Loströh CP, DiRusso CC, Spector MP, Wanner BL, Lee CA.** Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2000;182:1872-1882.
- Lucas RL, Lee CA.** Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 2000;36:1024-1033.
- Lucas RL, Lee CA.** Roles of *hilC* and *hilD* in regulation of *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2001;183:2733-2745.
- Lucchetti-Miganeh C, Burrowes E, Baysse C, Ermel G.** The post-transcriptional regulator CsrA plays a central role in the adaptation of bacterial pathogens to different stages of infection in animal hosts. *Microbiology* 2008;154:16-29.
- Lucchini S, Rowley G, Goldberg MD, Hurd D, Harrison M, Hinton JC.** H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog* 2006;2:e81.
- Ly KT, Casanova JE.** Mechanisms of *Salmonella* entry into host cells. *Cell Microbiol* 2007;9:2103-11.
- Madrid C, Nieto JM, Juarez A.** Role of the Hha/YmoA family of proteins in the thermoregulation of the expression of virulence factors. *Int J Med Microbiol* 2002;291:425-432.
- Main-Hester KL, Colpitts KM, Thomas GA, Fang FC, Libby SJ.** Coordinate regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 2008;76:1024-35.
- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM.** The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 2010;50:882-9.
- Mangan MW, Lucchini S, Danino V, Croinin TO, Hinton JCD, Dorman CJ.** The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 2006;59:1831-1847.
-
-

Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* 2000;2:145-156.

Martínez LC. Papel del regulador transcripcional SirA en la expresión de los genes de las islas de patogenicidad 1 y 2 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Tesis de maestría. UNAM 2007

Martínez LC, Yakhnin H, Camacho MI, Georgellis D, Babitzke P, Puente JL, Bustamante VH. Integration of a complex regulatory cascade involving the BarA/SirA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Mol Microbiol* 2011;80:1637-56.

Matsui M, Takaya A, Yamamoto T. Sigma32-mediated negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 expression. *J Bacteriol* 2008;190:6636-45.

Mayer, MP. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* 1995;163:41-46.

McCormick BA, Parkos CA, Colgan SP, Carnes DK, Madara JL. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by *Salmonella typhimurium*. *J Immunol* 1998;160:455-66.

Miao EA, Freeman JA, Miller SI. Transcription of the SsrAB regulon is repressed by alkaline pH and is independent of PhoPQ and magnesium concentration. *J Bacteriol* 2002;184:1493-7.

Mizusaki H, Takaya A, Yamamoto T, Aizawa S. Signal pathway in salt-activated expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2008;190:4624-4631.

Nakayama S, Kushiro A, Asahara T, Tanaka R, Hu L, Kopecko DJ, Watanabe H. Activation of *hilA* expression at low pH requires the signal sensor CpxA, but not the cognate response regulator CpxR, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* 2003;149:2809-2817.

Navarre WW, Porwollik S, Wang Y, McClelland M, Rosen H, Libby SJ, Fang FC. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* 2006;313:236-238.

Norris FA, Wilson MP, Wallis TS, Galyov EE, Majerus PW. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14057-9.

Ochman H, Groisman EA. Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. *Infect Immun* 1996;64:5410-5412.

Ochman H, Soncini FC, Solomon F, Groisman EA. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7800-7804.

Olekhovich IN, Kadner RJ. DNA-binding activities of the HilC and HilD virulence regulatory proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2002;184:4148-4160.

Olekhovich IN, Kadner RJ. Contribution of the RpoA C-terminal domain to stimulation of the *Salmonella enterica hilA* promoter by HilC y HilD. *J Bacteriol* 2004;186:3249-3253.

-
-
- Olekhovich IN, Kadner RJ.** Crucial Roles of Both Flanking Sequences in Silencing of the *hilA* promoter in *Salmonella enterica*. *J Mol Biol* 2006;357:373-386.
- Oropeza R, Sampieri CL, Puente JL, Calva E.** Negative and positive regulation of the non-osmoregulated ompS1 porin gene in *Salmonella typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Mol Microbiol* 1999;32:243-252.
- Padalon-Brauch G, Hershberg R, Elgrably-Weiss M, Baruch K, Rosenshine I, Margalit H, Altuvia S.** Small RNAs encoded within genetic islands of *Salmonella typhimurium* show host-induced expression and role in virulence. *Nucleic Acids Res* 2008;36:1913-1926.
- Pallen MJ, Beatson SA, Bailey CM.** Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type III secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiol Lett* 2005;29:201-229.
- Papenfert K, Vogel J.** Regulatory RNA in bacterial pathogens. *Cell Host Microbe* 2010;8:116-127.
- Paul L, Mishra PK, Blumenthal RM, Matthews RG.** Integration of regulatory signals through involvement of multiple global regulators: control of the *Escherichia coli* *gltBDF* operon by Lrp, IHF, Crp, and ArgR. *BMC Microbiol* 2007;7:2.
- Perez JC, Latifi T, Groisman EA.** Overcoming H-NS-mediated transcriptional silencing of horizontally acquired genes by the PhoP and SlyA proteins in *Salmonella enterica*. *J Biol Chem* 2008;283:10773-83.
- Pfeiffer V, Sittka A, Torner R, Tedin K, Brinkmann V, Vogel J.** A small non-coding RNA of the invasion gene island (SPI-1) represses outer membrane protein synthesis from the *Salmonella* core genome. *Mol Microbiol* 2007;66:1174-1191.
- Pizarro-Cerdá J, Tedin K.** The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. *Mol Microbiol* 2004;52:1827-44.
- Powell BS, Court DL, Inada T, Nakamura Y, Michotey V, Cui X, Reizer A, Saier MH Jr, Reizer J.** Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. Enzyme IIANtr affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an *erats* mutant. *J Biol Chem* 1995;270:4822-39.
- Prost LR, Sanowar S, Miller SI.** *Salmonella* sensing of anti-microbial mechanisms to promote survival within macrophages. *Immunol Rev* 2007;219:55-65.
- Prost LR, Miller SI.** The *Salmonellae* PhoQ sensor: mechanisms of detection of phagosome signals. *Cell Microbiol* 2008;10:576-82.
- Prouty AM, Gunn JS.** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion is repressed in the presence of bile. *Infect Immun* 2000;68:6763-6769.
- Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Dusold R, Rubino S, Bäumlér AJ.** The Vi capsular antigen of *Salmonella enterica* serotype Typhi reduces Toll-like receptor-dependent interleukin-8 expression in the intestinal mucosa. *Infect Immun* 2005;73:3367-74.
- Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, Winter SE, Godinez I, Sankaran S, Paixao TA, Gordon MA, Kolls JK, Dandekar S, Bäumlér AJ.** Simian immunodeficiency virus-induced
-
-

-
-
- mucosal interleukin-17 deficiency promotes *Salmonella* dissemination from the gut. *Nat Med* 2008a;14:421-8.
- Raffatellu M, Wilson RP, Winter SE, Bäumler AJ.** Clinical pathogenesis of typhoid fever. *J Infect Dev Ctries* 2008b;2:260-6.
- Romeo T.** Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol* 1998;29:1321-1330.
- Saini S, Rao CV.** SprB is the molecular link between *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4. *J Bacteriol* 2010;192:2459-62.
- Salcedo SP, Holden DW.** SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network. *EMBO J* 2003;22:5003-14
- Sanchez B, Urdaci MC, Margolles A.** Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa- bacteria interactions. *Microbiology* 2010;156:3232–3242.
- Santos RL, Zhang S, Tsois RM, Kingsley RA, Adams LG, Baumler AJ.** Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect* 2001;3:1335-1344.
- Santos RL, Tsois RM, Baumler AJ, Adams LG.** Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. *Braz J med Biol res* 2003;36:3-12.
- Santos RL, Raffatellu M, Bevins CL, Adams LG, Tükel C, Tsois RM, Bäumler AJ.** Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends Microbiol* 2009;17:498-506.
- Schechter LM, Damrauer SM, Lee CA.** Two AraC/XylS family members can independently counteract the effect of repressing sequences upstream of the *hilA* promoter. *Mol Microbiol* 1999;32:629-642.
- Schechter LM, Lee CA.** AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella typhimurium hilA* promoter. *Mol Microbiol* 2001;40:189-1299.
- Schechter LM, Jain S, Akbar S, Lee CA.** The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU, and Fis affect *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 2003;71:5432-5435.
- Schiemann DA.** Association with MDCK epithelial cells by *Salmonella typhimurium* is reduced during utilization of carbohydrates. *Infect Immun* 1995;63:1462-7
- Schmidt H, Hensel M.** Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:14-56.
- Shea JE, Hensel M, Gleeson C, Holden DW.** Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2593-2597.
- Silphaduang U, Mascarenhas M, Karmali M, Coombes BK.** Repression of Intracellular Virulence Factors in *Salmonella* by the Hha and YdgT Nucleoid-Associated Proteins. *J Bacteriol* 2007;189:3669-3673.
- Sittka A, Lucchini S, Papenfort K, Sharma CM, Rolle K, Binnewies TT, Hinton CD, Vogel J.** Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genet* 2008;4:e1000163.
-
-

Song M, Kim HJ, Kim EY, Shin M, Lee HC, Hong Y, Rhee JH, Yoon H, Ryu S, Lim S, Choy HE. ppGpp-dependent stationary phase induction of genes on *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Biol Chem* 2004;279:34183-90.

Song H, Kong W, Weatherspoon N, Qin G, Tyler W, Turk J, Curtiss R 3rd, Shi Y. Modulation of the regulatory activity of bacterial two-component systems by SlyA. *J Biol Chem* 2008;283:28158-68.

Stender S, Friebel A, Linder S, Rohde M, Miold S, Hardt WD. Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol Microbiol* 2000;36:1206-21.

Stoebel DM, Free A, Dorman CJ. Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram negative enteric bacteria. *Microbiology* 2008;154:2533-2545.

Suzuki K, Wang X, Weilbacher T, Pernestig AK, Melefors O, Georgellis D, Babitzke P, Romeo T. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2002;184:5130-5140.

Swinger KK, Rice PA. IHF and HU: Flexible architects of bent DNA. *Curr Opin Struct Biol* 2004;14:28-35.

Takaya A, Suzuki M, Matsui H, Tomoyasu T, Sashinami H, Nakane A, Yamamoto T. Lon, a stress-induced ATP-dependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of mice. *Infect Immun* 2003;71:690-696.

Takaya A, Kubota Y, Isogai E, Yamamoto T. 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* 2005;55:839-852

Teplitski M, Goodier RI, Ahmer BM. Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J Bacteriol* 2003;185:7257-7265.

Teplitski M, Goodier RI, Ahmer BM. Catabolite repression of the SirA regulatory cascade in *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 2006;296:449-466.

Thiennimitr P, Winter SE, Winter MG, Xavier MN, Tolstikov V, Huseby DL, Sterzenbach T, Tsohis RM, Roth JR, Baumler AJ. Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota. *Proc Nat Acad Sci* 2011;108:17480-17485.

Thijs IM, De Keersmaecker SC, Fadda A, Engelen K, Zhao H, McClelland M, Marchal K, Vanderleyden J. Delineation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulon through genome-wide location and transcript analysis. *J Bacteriol* 2007;189:4587-96.

Thompson A, Rolfe MD, Lucchini S, Schwerk P, Hinton JC, Tedin K. The bacterial signal molecule, ppGpp, mediates the environmental regulation of both the invasion and intracellular virulence gene programs of *Salmonella*. *J Biol Chem* 2006;281:30112-21.

Timmermans J, Van Melderen L. Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:2897-2908.

Tomljenovic-Berube, AM., Mulder, DT., Whiteside, MD., Brinkman, FSL., Coombes, BK. Identification of the regulatory logic controlling *Salmonella* pathoadaptation by the SsrA-SsrB two-component system. *PLoS Genet* 2010;6:e1000875.

Troxell B, Sikes ML, Fink RC, Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Hassan HM. Fur negatively regulates hns and is required for the expression of HilA and virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2011;193:497-505.

Tsolis RM, Townsend SM, Miao EA, Miller SI, Ficht TA, Adams LG. Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype typhimurium host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* 1999;67:6385–6393.

Tsolis RM, Xavier MN, Santos RL, Bäumlér AJ. How to become a top model: impact of animal experimentation on human *Salmonella* disease research. *Infect Immun* 2011;79:1806-14.

Tükel C, Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Akçelik M, Bäumlér AJ. Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: who is in the driver's seat? *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;46:320-9.

Uchiya K, Barbieri MA, Funato K, Shah AH, Stahl PD, Groisman EA. A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J* 1999;18:3924-33.

Uzzau S, Figueroa-Bossi N, Rubino S, Bossi L. Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:15264-15269.

Valdivia RH, Falkow S. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* 1997;277:2007-2011.

Valverde C, Heeb S, Keel C, Haas D. RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Microbiol* 2003;50:1361–1379 .

Vázquez-Torres A, Jones-Carson J, Bäumlér AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, Le M, Berggren R, Parks WT, Fang FC. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* 1999;401:804-808.

Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DW, Lucia SM, Dinaurer MC, Mastroeni P, Fang FC. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NAPH oxidase. *Science* 2000;287:1655-1658.

Vázquez-Torres A, Fang FC. *Salmonella* evasion of the NADPH phagocyte oxidase. *Microbes Infect* 2001;3:1313-1320.

Virlogeux-Payant I, Baucheron S, Pelet J, Trottereau J, Bottreau E, Velge P, Cloeckert A. TolC, but not AcrB, is involved in the invasiveness of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by increasing type III secretion system-1 expression. *Int J Med Microbiol* 2008;298:561-9.

Vivero A, Baños RC, Mariscotti JF, Oliveros JC, García-del Portillo F, Juárez A, Madrid C. Modulation of horizontally acquired genes by the Hha-YdgT proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 2008;190:1152-6.

Vogel J. A rough guide to the non-coding RNA world of *Salmonella*. *Mol Microbiol* 2009;71:1-11.

Von Gabain A, Belasco JG, Schottel JL, Chang ACY, Cohen SN. Decay of mRNA in *Escherichia coli*: investigation of the fate of specific segments of transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:653-657.

Walthers D, Carroll RK, Navarre WW, Libby SJ, Fang FC, Kenney LJ. 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* 2007;65:477-493.

Walthers D, Li Y, Liu Y, Anand G, Yan J., Kenney LJ. *Salmonella* enterica response regulator SsrB relieves H-NS silencing by displacing H-NS bound in polymerization mode and directly activates transcription. *J Biol Chem* 2011;286:1895-1902.

Waterman SR, Holden DW. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* 2003;5:501-11.

Weilbacher T, Suzuki K, Dubey K, Wang X, Gudapaty S, Morozov I, Baker CS, Georgellis D, Babitzke P, Romeo T. A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2003;48:657-670.

Wilson RL, Libby SJ, Freet AM, Boddicker JD, Fahlen TF, Jones BD. Fis, a DNA nucleoid-associated protein, is involved in *Salmonella typhimurium* SPI-1 invasion gene expression. *Mol Microbiol* 2001;39:79-88.

Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG, Butler BP, Huseby DL, Crawford RW, Russell JM, Bevins CL, Adams LG, Tsolis RM, Roth JR, Bäumlér AJ. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* 2010;467:426-9.

Wood MW, Jones MA, Watson PR, Hedges S, Walis TS, Galyov EE. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol Microbiol* 1998;29:883-891

Worley MJ, Ching KH, Heffron F. *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Mol Microbiol* 2000;36:749-61.

Xu X, Hensel M. Systematic analysis of the SsrAB virulon of *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 2010;78:49-58.

Yakhnin AV, Trimble JJ, Chiaro CR, Babitzke P. Effects of mutations in the L-tryptophan binding pocket of the Trp RNA-binding attenuation protein of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 2000;275:4519-4524.

Yakhnin H, Pandit P, Petty TJ, Baker CS, Romeo T, Babitzke P. CsrA of *Bacillus subtilis* regulates translation initiation of the gene encoding the flagellin protein (*hag*) by blocking ribosome binding. *Mol Microbiol* 2007;64:1605-1620.

Zhang S, Santos RL, Tsolis RM, Stender S, Hardt WD, Bäumlér AJ, Adams LG. The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect Immun* 2002;70:3843-3855.

Zhang S, Kingsley RA, Santos RL, Andrews-Polymeris H, Raffatellu M, Figueiredo J, Nunes J, Tsolis RM, Adams LG, Bäumlér AJ. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect Immun* 2003;71:1-12.

Zhou D, Mooseker MS, Galám JE. Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* 1999a;283:2092-2095.

Zhou D, Mooseker MS, Galám JE. An invasion-associated *Salmonella* protein modulates the actin-bundling activity of plastin. *Proc Natl Acad Sci* 1999b;96:10176-10181.

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

9. ANEXO (ARTÍCULOS PUBLICADOS)

Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD

Luay C. Martínez,¹ Helen Yakhnin,²
Martha I. Camacho,³ Dimitris Georgellis,³
Paul Babitzke,² José L. Puente¹ and
Víctor H. Bustamante^{1*}

¹Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico.

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center for RNA Molecular Biology, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA.

³Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 04510, Mexico.

Summary

Salmonella pathogenicity islands 1 and 2 (SPI-1 and SPI-2) play key roles in the pathogenesis of *Salmonella enterica*. Previously, we showed that when *Salmonella* grows in Luria–Bertani medium, HilD, encoded in SPI-1, first induces the expression of *hilA*, located in SPI-1, and subsequently of the *ssrAB* operon, located in SPI-2. These genes code for HilA and the SsrA/B two-component system, the positive regulators of the SPI-1 and SPI-2 regulons respectively. In this study, we demonstrate that CsrA, a global regulatory RNA binding protein, post-transcriptionally regulates *hilD* expression by directly binding near the Shine–Dalgarno and translation initiation codon sequences of the *hilD* mRNA, preventing its translation and leading to its accelerated turnover. Negative regulation is counteracted by the global SirA/BarA two-component system, which directly activates the expression of CsrB and CsrC, two non-coding regulatory RNAs that sequester CsrA, thereby preventing it from binding to its target mRNAs. Our results illustrate the integration of global and specific regulators into a multifactorial regulatory

cascade controlling the expression of virulence genes acquired by horizontal transfer events.

Introduction

Horizontal transfer of DNA fragments, encoding for a variety of virulence factors, has been of paramount importance in the evolution of pathogenic bacteria by providing the ability to survive in and exploit different host niches and thus to cause different diseases (Ochman *et al.*, 2000; Schmidt and Hensel, 2004). To take advantage of the genetic information contained in the acquired genes, bacteria had to adapt regulatory mechanisms to control their potentially deleterious expression under non-permissive conditions, and to induce their appropriate spatiotemporal expression inside the hosts to establish an infection.

Salmonella are Gram-negative bacteria comprising around 2500 serotypes, many of which are important human and animal pathogens. Two major clinical manifestations characterize *Salmonella* infections: enteritis (salmonellosis), a self-limiting local intestinal inflammatory response, and enteric fever (typhoid), a systemic infection characterized by the dissemination of the bacteria throughout the reticuloendothelial system via infected macrophages to the lymph nodes, liver and spleen (Ohl and Miller, 2001; Haraga *et al.*, 2008). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (*S. Typhimurium*) can produce enteritis in humans, calves or chickens, whereas in mice it causes a systemic infection similar to human typhoid fever produced by serotype Typhi (Ohl and Miller, 2001; Haraga *et al.*, 2008); thus it is frequently used as a model to study *Salmonella* pathogenesis. Most of the *Salmonella* virulence genes are located within distinct genomic regions denominated *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs), which have been acquired by independent horizontal transfer events (Groisman and Ochman, 1997; Marcus *et al.*, 2000). SPI-1 and SPI-2, composed by 39 and 44 genes, respectively, play a key role in *Salmonella* pathogenesis (Hansen-Wester and Hensel, 2001). Each pathogenicity island encodes a type three secretion

Accepted 18 April, 2011. *For correspondence. E-mail victor@ibt.unam.mx; Tel. (+52) (777) 329 1627; Fax (+52) (777) 313 8673.

system (T3SS), different effector proteins, which are translocated into the host cells by their cognate T3SS, chaperones and transcriptional regulators that control the expression of the genes within each island (Hensel, 2000; Marcus *et al.*, 2000; Hansen-Wester and Hensel, 2001). SPI-1 genes are necessary for the invasion of epithelial host cells, thus for the intestinal colonization leading to enteritis; whereas SPI-2 genes are required for bacterial replication/survival inside macrophages, and thus for the systemic disease (Hensel *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2003; Haraga *et al.*, 2008). However, different studies have revealed that SPI-2 genes also play a role in the development of the intestinal inflammatory disease and, accordingly, they are expressed in the intestinal lumen (Bispham *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2005; Coburn *et al.*, 2005; Coombes *et al.*, 2005; Hapfelmeier *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2007).

In vitro, SPI-1 genes are expressed when *Salmonella* grows in the nutrient-rich medium Luria–Bertani (LB) (Lundberg *et al.*, 1999; Miao and Miller, 2000), and are regulated by environmental conditions such as osmolarity, oxygen concentration and pH (Altier, 2005; Jones, 2005; Ellermeier and Schlauch, 2007). Under these growth conditions, two AraC-like transcriptional regulators, HilD and HilC, encoded within SPI-1, activate *hilA* expression (Schechter *et al.*, 1999; Schechter and Lee, 2001; Ellermeier *et al.*, 2005), the central positive regulator of SPI-1, by counteracting the repression exerted by the global repressor H-NS on the *hilA* promoter (Schechter *et al.*, 2003; Olekhovich and Kadner, 2006). HilA then directly activates expression of genes encoding T3SS components (Eichelberg and Galan, 1999; Lostroh *et al.*, 2000; Lostroh and Lee, 2001), as well as the expression of another AraC-like transcriptional regulator, InvF (Lostroh *et al.*, 2000), which in turn activates the expression of genes encoding effector proteins (Darwin and Miller, 1999; Eichelberg and Galan, 1999).

The SPI-2 genes are expressed during late stationary phase when *Salmonella* grows in LB medium (Bustamante *et al.*, 2008) or in acidic minimal media containing low concentrations of phosphate, calcium and magnesium (Deiwick *et al.*, 1999; Miao and Miller, 2000). The SPI-2-encoded SsrA/SsrB two-component regulatory system (Cirillo *et al.*, 1998; Deiwick *et al.*, 1999; Worley *et al.*, 2000), controls the expression of the SPI-2 regulon mainly by counteracting the repression exerted by H-NS on genes located within and outside the island (Walthers *et al.*, 2007; 2011).

In addition to these regulators, other regulatory proteins encoded outside of these islands have been shown to be involved in controlling the expression of the SPI-1 and SPI-2 regulons (reviewed by Altier, 2005; Jones, 2005; Ellermeier and Schlauch, 2007; Fass and Groisman, 2009).

Previous reports have shown that the global transcriptional regulator SirA positively controls the expression of the SPI-1 genes (Johnston *et al.*, 1996; Ahmer *et al.*, 1999; Teplitski *et al.*, 2003). SirA is a member of the FixJ family of response regulators, forming a two-component regulatory system with the sensor kinase protein BarA (Altier *et al.*, 2000a; Teplitski *et al.*, 2003). SirA/BarA orthologues are present in many bacteria, including *Escherichia coli* (UvrY/BarA), *Pseudomonas* species (GacA/GacS), *Vibrio cholerae* (VarA/VarS), *Erwinia carotovora* (ExpA/ExpS) and *Legionella pneumoniae* (LetA/LetS), where they control the expression of genes associated with virulence, secondary metabolism, motility, exoenzyme production, quorum sensing or biofilm formation (Goodier and Ahmer, 2001; Lapouge *et al.*, 2008). In *E. coli*, UvrY/BarA activates expression of two non-translated small RNAs, CsrB and CsrC, each of which contains several motifs recognized by the RNA binding protein CsrA (Suzuki *et al.*, 2002; Weilbacher *et al.*, 2003; Babitze and Romeo, 2007). CsrA is a homodimeric protein that binds to sequences overlapping the Shine–Dalgarno (SD) sequence in target mRNAs, thus blocking ribosome binding and translation, and promoting their degradation (Baker *et al.*, 2002; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008; Timmermans and Van Melderen, 2010). CsrB and CsrC antagonize CsrA function by sequestering this protein, thus counteracting its translational repression activity (Weilbacher *et al.*, 2003; Babitze and Romeo, 2007; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008; Timmermans and Van Melderen, 2010).

Here we demonstrate that the SirA/BarA two-component system and the Csr post-transcriptional regulatory system regulate the expression of both the SPI-1 and SPI-2 genes in *Salmonella* growing in LB medium. SirA activates the expression of CsrB and CsrC, which counteract the post-transcriptional repression exerted by CsrA, whose binding sites overlap the SD sequence and translation initiation codon of *hilD* mRNA. HilD then activates expression of *hilA* and *ssrAB*, the genes encoding the central regulators of SPI-1 and SPI-2 respectively. This study integrates a regulatory cascade constituted by global and horizontally acquired regulatory elements that controls the expression of the SPI-1 and SPI-2 regulons.

Results

SirA is involved in the expression of the SPI-2 regulon

Recently, we demonstrated that the SPI-2 genes are expressed when *S. Typhimurium* grows in the nutritionally rich medium LB (Bustamante *et al.*, 2008). Under this growth condition the SPI-1-encoded regulator HilD activates the sequential expression of the SPI-1 and SPI-2

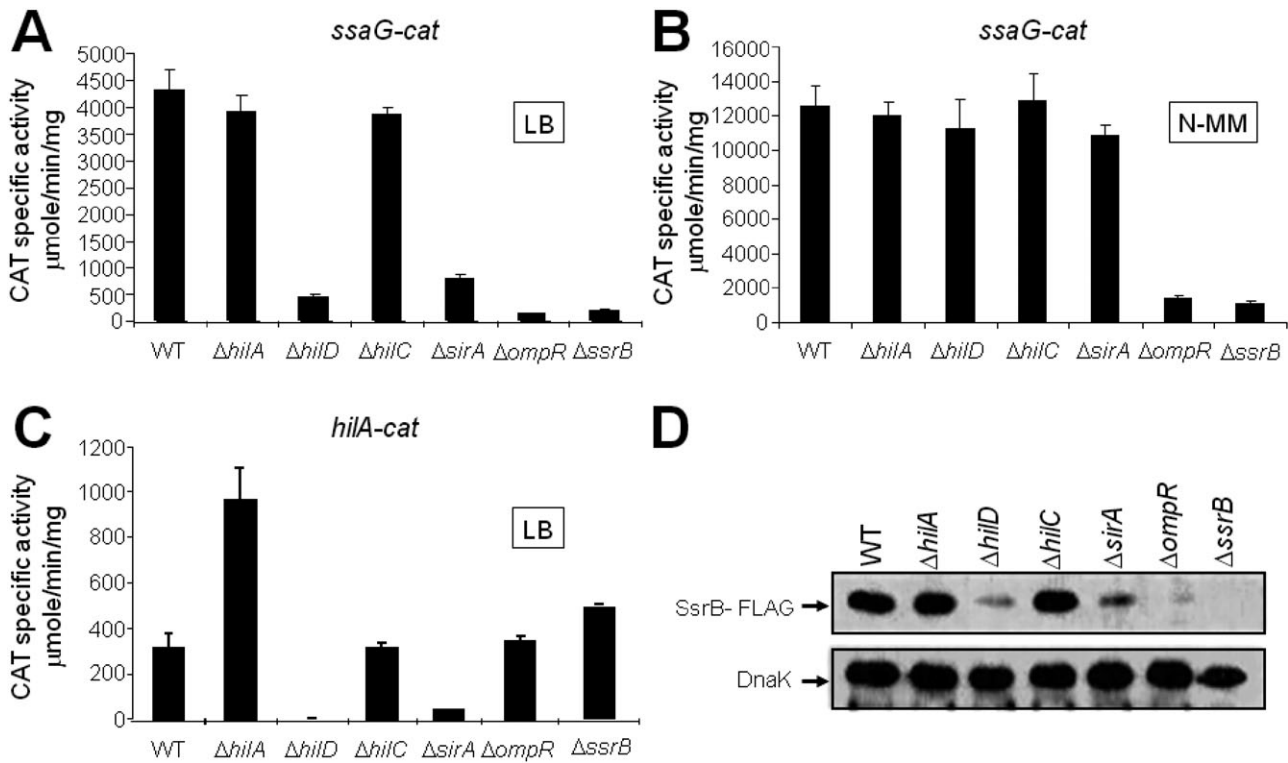


Fig. 1. SirA is involved in the expression of the SPI-2 genes. Expression of the *ssaG-cat* transcriptional fusion contained in *pssaG-cat1* was analysed in WT and isogenic $\Delta hilA::kan$, $\Delta hilD::kan$, $\Delta hilC::kan$, $\Delta sirA::kan$, $\Delta ompR::kan$ and $\Delta ssrB::kan$ strains, grown in LB (A) or in N-MM (B) for 10 and 16 h, respectively, at 37°C. C. Expression of the *hilA-cat* transcriptional fusion contained in *phlA-cat1* was determined in WT and isogenic $\Delta hilA::kan$, $\Delta hilD::kan$, $\Delta hilC::kan$, $\Delta sirA::kan$, $\Delta ompR::kan$ and $\Delta ssrB::kan$ strains, grown in LB for 5 h at 37°C. CAT-specific activity was determined as described in *Experimental procedures*. Data are the average of three independent experiments done in duplicate. Bars represent the standard deviations. D. Western blot analysis of SsrB expression in WT and isogenic $\Delta hilA$, $\Delta hilD$, $\Delta hilC$, $\Delta sirA$ and $\Delta ompR$ strains carrying a chromosomal FLAG-tagged *ssrB* gene, using monoclonal anti-FLAG antibodies. Samples were taken from cultures grown for 10 h in LB at 37°C. As a loading control, the expression of DnaK was also determined using monoclonal anti-DnaK antibodies.

regulons at the early and late stationary phases of growth respectively. In this study, we investigated the possibility that, in addition to HilD, other reported SPI-1 regulators could be involved in controlling the expression of SPI-2 genes. Previous studies have shown that the global SirA/BarA two-component system positively regulates the expression of SPI-1 (Johnston *et al.*, 1996; Ahmer *et al.*, 1999; Altier *et al.*, 2000a; Teplitski *et al.*, 2003) and SPI-4 genes (Gerlach *et al.*, 2007).

To investigate if SirA also regulates the SPI-2 genes, we analysed the expression of a transcriptional fusion of the *ssaG* (SPI-2) promoter to the *cat* (chloramphenicol acetyl transferase) reporter gene, in wild-type (WT) *S. Typhimurium* strain SL1344 and its $\Delta sirA$ derivative, as well as in the $\Delta hilC$, $\Delta hilA$, $\Delta hilD$, $\Delta ompR$ and $\Delta ssrB$ mutants. Each strain was grown in LB or in N-minimal medium (N-MM), two different *in vitro* growth conditions shown to sustain the expression of SPI-2 genes (Deiwick *et al.*, 1999; Miao and Miller, 2000; Bustamante *et al.*, 2008). Expression of *ssaG-cat* showed a similar reduction in the $\Delta sirA$ and $\Delta hilD$ mutants grown in LB with respect to the WT strain

(Fig. 1A), but was not affected when they were grown in N-MM (Fig. 1B). These results are consistent with our previous observations indicating that HilD is required for the expression of the SPI-2 genes when *Salmonella* grows in LB but not in N-MM (Bustamante *et al.*, 2008). Also in accordance with our previous results (Bustamante *et al.*, 2008), expression of *ssaG* was reduced in both LB and N-MM in the $\Delta ompR$ and $\Delta ssrB$ mutants, which lack the SPI-2 regulators OmpR and SsrB. In contrast, expression was not affected in the $\Delta hilA$ and $\Delta hilC$ mutants that lack the SPI-1 regulators HilA and HilC (Fig. 1A and B). As a control, we determined the expression of a *hilA-cat* transcriptional fusion in the same strains grown in LB. In agreement with previous studies showing that both SirA and HilD positively regulate *hilA* (SPI-1) expression (Johnston *et al.*, 1996; Ahmer *et al.*, 1999; Schechter *et al.*, 1999; Schechter and Lee, 2001; Schechter *et al.*, 2003; Teplitski *et al.*, 2003; Ellermeier *et al.*, 2005; Olekhovich and Kadner, 2006), expression of the *hilA-cat* fusion was reduced in the $\Delta sirA$ and $\Delta hilD$ mutants, but was not affected in the $\Delta ompR$, $\Delta ssrB$ and $\Delta hilC$ mutants

(Fig. 1C). Furthermore, expression of the *hilA-cat* fusion increased in the $\Delta hilA$ mutant (Fig. 1C), consistent with a previous study showing that HilA negatively regulates its own expression (De Keersmaecker *et al.*, 2005). Taken together, these results indicated that SirA, in addition to HilD, OmpR and SsrB, is required for the expression of SPI-2 genes when *Salmonella* grows in LB.

To determine if SirA controls *ssaG* expression, and thus of other SPI-2 genes, by regulating the *ssrAB* operon, we analysed the expression of SsrB in WT and $\Delta sirA$ strains, as well as in the $\Delta hilA$, $\Delta hilD$, $\Delta hilC$, and $\Delta ompR$ mutants, which were tested as controls. To follow the expression of SsrB, the *ssrB* chromosomal gene was tagged with the sequence encoding a 3 \times FLAG epitope, rendering strains expressing a C-terminal 3 \times FLAG-tagged SsrB protein (SsrB-FLAG). Total protein extracts were obtained from culture samples of these strains grown in LB and analysed by Western blotting. In agreement with the results shown in Fig. 1A, expression of SsrB-FLAG was drastically reduced in the $\Delta sirA$, $\Delta hilD$ and $\Delta ompR$ mutants, but not in the $\Delta hilA$ and $\Delta hilC$ mutants (Fig. 1D). In contrast, when these strains were grown in N-MM, SsrB-FLAG expression was not affected in the $\Delta sirA$ and $\Delta hilD$ mutants, but was still highly reduced in the $\Delta ompR$ mutant (data not shown). Together, these results indicated that expression of the SsrA/B system and, as a consequence, the SPI-2 genes, requires the HilD, OmpR and SirA proteins when *S. Typhimurium* is grown in LB.

SirA controls the expression of SPI-1 and SPI-2 genes by regulating HilD expression

HilD and OmpR positively regulate *ssrAB* expression by directly binding to its regulatory region (Lee *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2003; 2004; Bustamante *et al.*, 2008). Because the expression of OmpR was not affected in the absence of SirA or HilD (data not shown), we hypothesized that SirA could regulate the expression of the *ssrAB* operon directly, acting along with HilD and OmpR, or indirectly by controlling the expression of HilD in a cascade fashion. To distinguish between these possibilities, we first analysed the expression of SsrB-FLAG by Western blot in the $\Delta hilD$ and $\Delta sirA$ mutants containing plasmids pBAD-HilD1 or pBAD-SirA1, expressing HilD and SirA respectively. Expression of HilD from plasmid pBAD-HilD1 restored the expression of SsrB-FLAG in both the $\Delta hilD$ and $\Delta sirA$ mutants to a level that was similar to the WT strain (Fig. 2A). In contrast, expression of SirA from plasmid pBAD-SirA1 only restored the expression of SsrB-FLAG in the $\Delta sirA$ mutant (Fig. 2A). Similar results were obtained when the expression of a C-terminal 3 \times FLAG-tagged HilA protein (HilA-FLAG) or of the *hilA-cat* fusion was determined in the same genetic

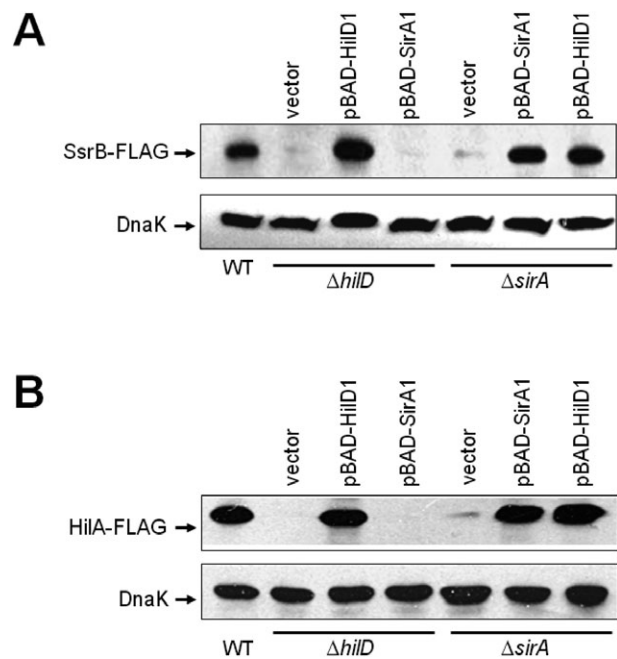


Fig. 2. SirA activates the expression of SsrB and HilA through HilD. Expression of SsrB (A) and HilA (B) in WT, $\Delta hilD$ and $\Delta sirA$ strains carrying a chromosomal FLAG-tagged *ssrB* or *hilA* gene, and containing vector pBADMyHisC, or plasmids pBAD-HilD1 or pBAD-SirA1, was analysed by Western blotting using monoclonal anti-FLAG antibodies. Whole-cell lysates were prepared from samples of bacterial cultures grown in LB for 10 or 5 h, for detection of SsrB-FLAG and HilA-FLAG, respectively, at 37°C. As a control, the expression of DnaK was also determined using monoclonal anti-DnaK antibodies. Expression of HilD and SirA from plasmids pBAD-HilD1 and pBAD-SirA1, respectively, was induced by adding 0.1% L-arabinose to the medium at the beginning of the bacterial cultures.

backgrounds containing plasmids expressing HilD or SirA (Figs 2B and S1).

These results show that HilD is able to activate the expression of *ssrAB* and *hilA* in the absence of SirA, whereas SirA requires the presence of HilD, suggesting that SirA controls HilD expression, which in turn directly regulates *hilA* and *ssrAB*. In agreement with this notion, the presence of pT3-HilD1, but not of pK3-SirA1, activated expression of *hilA-cat*, *hilC-cat* and *rtsA-cat* transcriptional fusions in the absence of any other *Salmonella*-specific regulatory protein, as it was determined in an *E. coli* $\Delta uvrY$ mutant lacking UvrY, the *E. coli* orthologue of SirA (Fig. S2). In contrast, expression of a *csrB-cat* transcriptional fusion was activated in the presence of pK3-SirA1, but not of pT3-HilD1 (Fig. S2). These results are in agreement with previous studies showing that HilD directly regulates *hilA*, *hilC* and *rtsA* (Schechter *et al.*, 1999; Schechter and Lee, 2001; Ellermeier *et al.*, 2005) and that SirA directly controls the expression of *csrB* (Teplitski *et al.*, 2003; Teplitski *et al.*, 2006).

The results described above suggest that the SirA/BarA system controls HilD expression. To further determine the extent to which the SirA/BarA system controls *hilD* expression, we analysed the activity of a *hilD-cat* transcriptional fusion and measured *hilD* mRNA levels by q-RT-PCR in WT, $\Delta sirA$ and $\Delta barA$ strains. As HilD has also been reported to positively regulate its own expression (Olekhovich and Kadner, 2002; Ellermeier *et al.*, 2005), the expression of *hilD* was also tested in the $\Delta hilD$ mutant. Expression of *hilD* was similarly reduced in the $\Delta sirA$ and $\Delta barA$ mutants and to a greater extent in the $\Delta hilD$ mutant (Fig. 3). These results, together with those from previous studies (Lucas and Lee, 2001; Ellermeier *et al.*, 2005; Mizusaki *et al.*, 2008), demonstrate that the SirA/BarA system positively regulates the expression of *hilD*.

SirA binds to the csrB and csrC regulatory regions, but not to those of hilD, hilA, hilC or ssrAB

The results described above are consistent with the notion that SirA acts through HilD to indirectly control the expression of *hilA* and *ssrAB*. In this regard, results from a previous study suggested that SirA most likely acts along with HilD or through HilD to control *hilA* expression and thus SPI-1 regulation (Ellermeier *et al.*, 2005). Moreover, it is known that SirA regulates the expression of CsrB and CsrC and that these non-coding RNAs positively regulate *Salmonella* invasion and expression of SPI-1 genes (Altier *et al.*, 2000a; Teplitski *et al.*, 2003; Fortune *et al.*, 2006; Teplitski *et al.*, 2006). However, it has also been shown that SirA binds to the regulatory regions of *hilA* and *csrB*, but that it does not bind to the regulatory regions of *hilD* and *csrC* (Teplitski *et al.*, 2003; Teplitski *et al.*, 2006).

To further dissect and clarify the mechanism by which SirA regulates the expression of SPI-1 and SPI-2 genes, we analysed the interaction of this protein with the regulatory regions of genes under the control of the SirA cascade. SirA was purified as an MBP-SirA fusion protein expressed from plasmid pMAL-SirA1 (as described in *Experimental procedures* section in *Supporting information*). SPI-1 protein secretion was restored in the $\Delta sirA$ mutant carrying plasmid pMAL-SirA1 (data not shown), confirming the functionality of MBP-SirA. Binding of phosphorylated and non-phosphorylated purified MBP-SirA to a ^{32}P -5'-end-labelled PCR product spanning the regulatory region of *csrB* was tested by electrophoretic mobility shift assays (EMSA) to further verify the functionality of the fusion protein. MBP-SirA similarly shifted the *csrB* fragment whether it was phosphorylated or not, starting at a concentration of 1.5 μM (Fig. S3A), indicating that MBP-SirA phosphorylation is not required for DNA binding *in vitro*, which is consistent with previous results showing that phosphorylation only increases the DNA binding affinity of SirA-His6X by approximately twofold

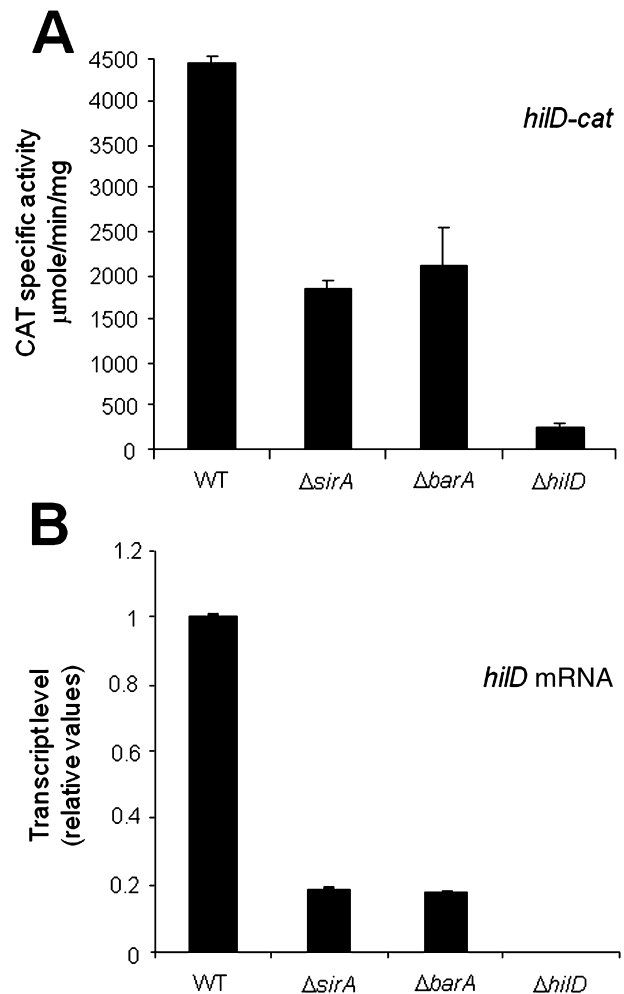


Fig. 3. SirA and its cognate sensor kinase protein BarA positively regulate the expression of *hilD*. Expression of *hilD* was determined in WT and isogenic $\Delta sirA$, $\Delta barA::kan$ and $\Delta hilD$ strains, by monitoring expression of the *hilD-cat* transcriptional fusion contained in *phlD-cat1* (A) or by quantifying the *hilD* mRNA by q-RT-PCR (B), from samples of bacterial cultures grown for 5 h in LB at 37°C. *dnaK* was used as the internal control to normalize the results obtained for the expression of *hilD* by q-RT-PCR. Data for the CAT-specific activity are the average of three independent experiments done in duplicate. The data for the q-RT-PCR assays indicate the relative expression of *hilD*, with respect to its expression in the WT strain, and are the average of two independent experiments done in triplicate. Bars represent the standard deviations.

(Teplitski *et al.*, 2003). SirA phosphorylation *in vivo* seems to be critical for its function, because when its predicted phosphorylated residue, Asp54, is substituted for an alanine, or in the absence of its cognate sensor kinase BarA, *csrB* expression is not induced (data not shown). Therefore, it is likely that the *in vitro* conditions used to test SirA DNA binding, or the fusion of SirA to the MBP or to the His6X tag, rendered a SirA protein that specifically binds to its target DNA sequences regardless of its phosphorylation state.

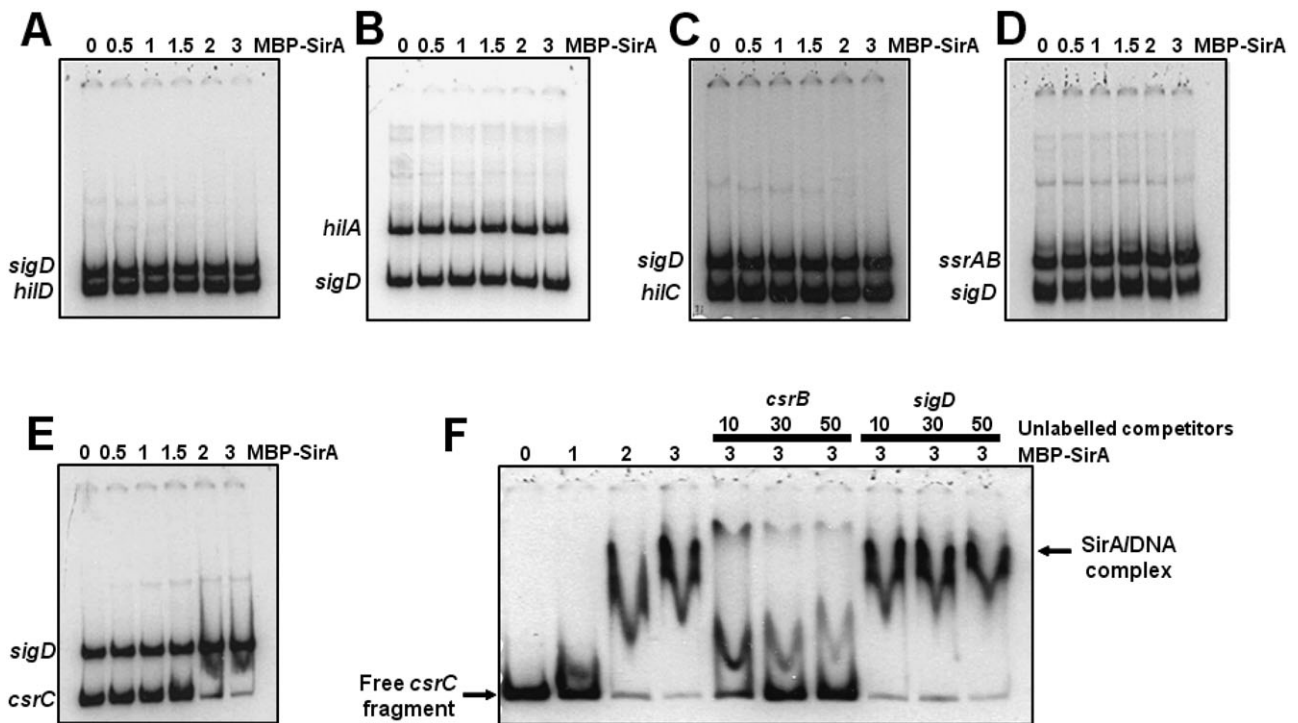


Fig. 4. SirA specifically binds to *csrC* but not to *hilD*, *hilA*, *hilC* or *ssrAB*. EMSAs were performed to analyse SirA binding to *hilD* (A), *hilA* (B), *hilC* (C), *ssrAB* (D) and *csrC* (E). 32 P-5'-end-labelled DNA fragments containing the regulatory region of the respective gene were incubated with increasing concentrations of phosphorylated MBP-SirA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0 μ M). These DNA fragments correspond to those contained in the *hilD-cat*, *hilA-cat*, *hilC-cat*, *ssrAB-cat* and *csrC-cat* transcriptional fusions, which were regulated by SirA. As a negative control, a fragment containing the regulatory region of *sigD*, was included in each DNA binding reaction. SirA binding to *csrC* was further analysed by competitive EMSA (F). The 32 P-5'-end-labelled DNA fragment containing the regulatory region of *csrC* was mixed with 1, 2 or 3 μ M of phosphorylated MBP-SirA in the absence or presence of 10-, 30- and 50-fold excess of unlabelled specific (*csrB*) or non-specific (*sigD*) competitors. The DNA-protein complexes were resolved in a non-denaturing 6% polyacrylamide gel.

In contrast, a DNA fragment containing the regulatory region of *sigD*, which was used as a negative control, was not shifted even at a concentration of 3 μ M (Fig. S3A). Specific binding was confirmed by competing MBP-SirA binding to the labelled *csrB* fragment with 10- to 50-fold excess of unlabelled specific (*csrB*) and non-specific (*sigD*) fragments by EMSA. As shown in Fig. S3B, only the unlabelled *csrB* fragment was able to compete with the interaction of MBP-SirA with the labelled fragment of *csrB*.

We next performed EMSAs with phosphorylated MBP-SirA and labelled DNA fragments containing the regulatory regions of *hilD*, *hilA*, *hilC*, *ssrAB* and *csrC*. The DNA fragments used for the EMSAs were those used to construct the corresponding transcriptional fusions that showed SirA-mediated regulation (Figs 5 and S4). The fragments spanning the *hilD*, *hilA*, *hilC*, *ssrAB* and *sigD* regulatory regions were not shifted by phosphorylated MBP-SirA up to a concentration of 3 μ M (Fig. 4A–D). Similar results were obtained using non-phosphorylated MBP-SirA (data not shown). At higher concentrations (≥ 5 μ M), phosphorylated or non-phosphorylated MBP-SirA bound to all of these fragments, including *sigD*,

suggesting that MBP-SirA binds non-specifically at these concentrations (data not shown). In contrast, *csrC* was bound by MBP-SirA, starting at a concentration of 2 μ M (Fig. 4E). Specific binding to the *csrC* regulatory region was also confirmed by competitive EMSAs, as described above for *csrB*. Only a 10- to 50-fold excess of unlabelled *csrC* fragment, but not of the unlabelled non-specific *sigD* fragment, was able to disrupt the interaction of MBP-SirA with the *csrC* labelled fragment (Fig. 4F), confirming the specific binding of MBP-SirA to *csrC*. SirA-mediated regulation of *csrB* and *csrC* in the strain used in this study (*S. Typhimurium* SL1344), was confirmed by analysing the expression of *csrB-cat* and *csrC-cat* transcriptional fusions in the WT and Δ *sirA* strains (Fig. S4).

The lack of binding of MBP-SirA to the *hilD*, *hilA* and *ssrAB* regulatory regions is in agreement with the genetic evidence indicating that the SirA/BarA system regulates the expression of *hilD*, and thus of *ssrAB* and *hilA*, indirectly. In contrast, specific binding of MBP-SirA to both the *csrB* and *csrC* regulatory regions supports the notion that the SirA-mediated expression of *hilD* is regulated by the Csr system.

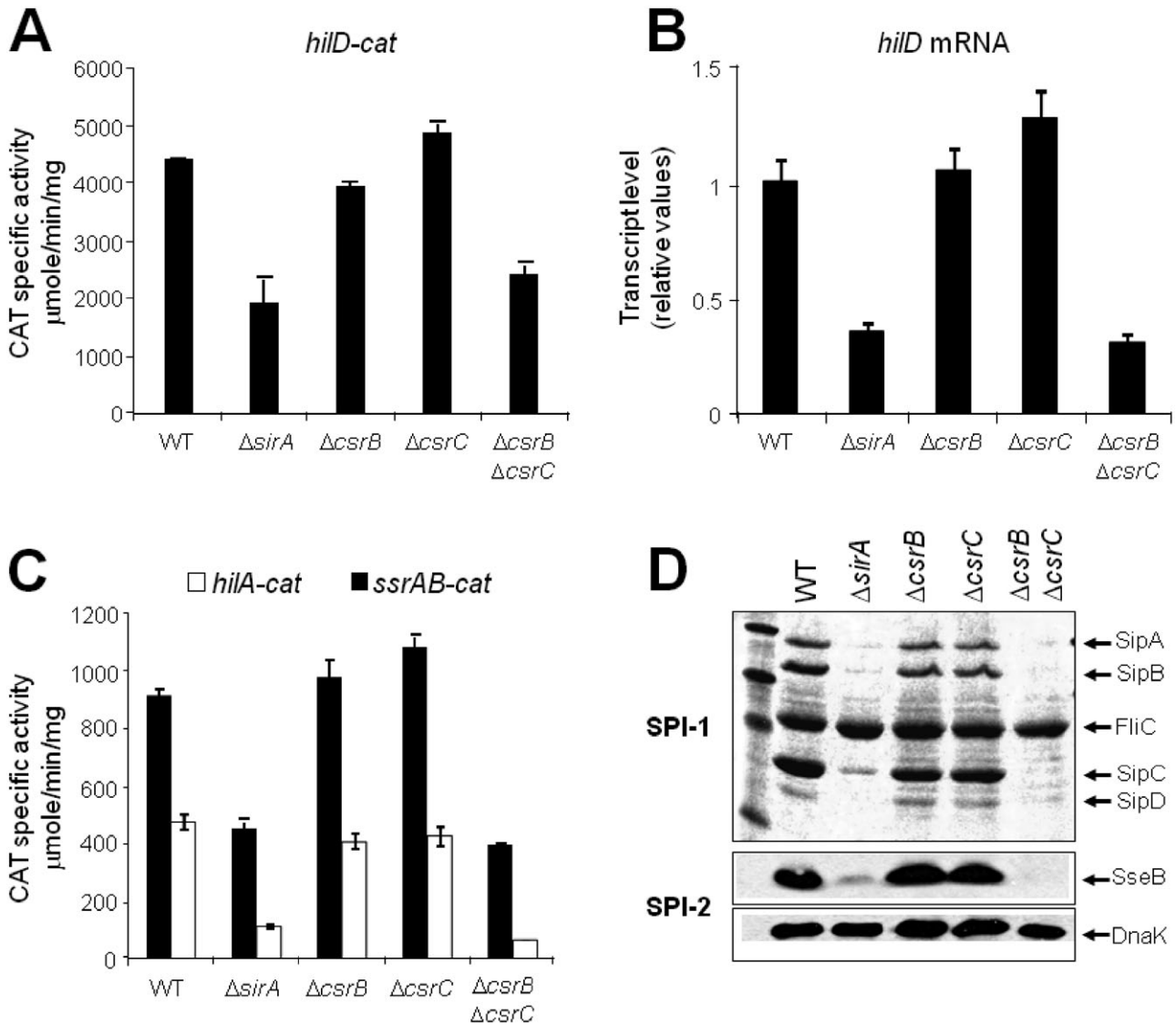


Fig. 5. SirA and CsrB/C are similarly required for the expression of *hilD* and therefore of the SPI-1 and SPI-2 genes. Expression of the transcriptional fusions *hilD-cat* (A), *hilA-cat* and *ssrAB-cat* (C) contained in *phlD-cat1*, *phlA-cat1* and *pssrAB-cat1*, respectively, was determined in WT *S. Typhimurium* and its isogenic $\Delta sirA$, $\Delta csrB::kan$, $\Delta csrC::kan$ and $\Delta csrB \Delta csrC::kan$ mutant strains. CAT-specific activity was determined from samples collected from bacterial cultures grown for 5 h in LB at 37°C (for *hilD* and *hilA* fusions) or 10 h (for *ssrAB* fusion), as described in *Experimental procedures*. The data are the average of three independent experiments done in duplicate. Bars represent the standard deviations. The *hilD* mRNA was quantified by q-RT-PCR (B) using total RNA samples from the same strains mentioned above and as described in Fig. 3. Supernatants and whole-cell extracts from culture samples of the same strains grown for 9 h at 37°C, were used to analyse the secretion of the SPI-1-encoded proteins SipA, SipB, SipC and SipD (D, upper) and the expression of the SPI-2 effector protein SseB (D, lower) respectively. FliC is a flagellar protein whose secretion is not SPI-1 dependent. As a loading control, DnaK expression levels were also determined using the same whole-cell extracts and a monoclonal anti-DnaK antibody.

SirA controls the expression of *HilD* through the *CsrB* and *CsrC* RNA molecules

In other bacteria, SirA/BarA orthologues control gene expression in a cascade fashion by directly activating the expression of *csrB* and *csrC*, encoding the small untranslated RNA molecules CsrB and CsrC respectively (Babitzke and Romeo, 2007; Lapouge *et al.*, 2008; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008).

Therefore, to determine if SirA regulates expression of *hilD* and the SPI-1 and SPI-2 genes through CsrB and CsrC, single $\Delta csrB$ and $\Delta csrC$ mutants, as well as a $\Delta csrB \Delta csrC$ double mutant, were constructed as described in *Experimental procedures*. Expression of the *hilD-cat* (SPI-1), *hilA-cat* (SPI-1), *ssrAB-cat* (SPI-2) and *ssaG-cat* (SPI-2) transcriptional fusions was determined in these mutants and compared with their expression in WT and $\Delta sirA$ strains; additionally, the level of the *hilD* mRNA was

measured by q-RT-PCR. Expression of *hilD* was not appreciably affected in the single $\Delta csrB$ or $\Delta csrC$ mutants; however, expression in the $\Delta csrB \Delta csrC$ double mutant strain was reduced to the level observed in the $\Delta sirA$ mutant (Fig. 5A and B). As expected, expression of the *hilA*, *ssrAB* and *ssaG* fusions was also reduced in the $\Delta csrB \Delta csrC$ double mutant and in the $\Delta sirA$ mutant, but not in the single $\Delta csrB$ and $\Delta csrC$ mutants (Fig. 5C and data not shown). Furthermore, the secretion of the SPI-1-encoded proteins SipA, SipB, SipC and SipD (Fig. 5D, upper), as well as the expression of the SPI-2-encoded effector protein SseB (Fig. 5D, lower), were considerably reduced in the $\Delta csrB \Delta csrC$ double mutant and, as expected, in the $\Delta sirA$ mutant, but not in the single $\Delta csrB$ and $\Delta csrC$ mutants. In agreement with these results, a previous study reported that the expression of *hilA* and *sipC* (a SPI-1 gene), decreased in a $\Delta csrB \Delta csrC$ double mutant, while it was not affected in $\Delta csrB$ and $\Delta csrC$ single mutants (Fortune *et al.*, 2006). It has been demonstrated that the loss of CsrB causes a compensatory increase in CsrC levels and vice versa (Weilbacher *et al.*, 2003; Fortune *et al.*, 2006), which probably explains why the $\Delta csrB \Delta csrC$ double mutant, but not the single mutants, affected expression of the SPI-1 and SPI-2 genes.

To further investigate if SirA acts only through CsrB/C or has an additional CsrB/C-independent regulatory role on the expression of *hilD* or the SPI-1 and SPI-2 genes, we analysed the expression of the *hilD-cat*, *hilA-cat* and *ssaG-cat* fusions in the $\Delta sirA$ mutant containing plasmids pMPM-K3 (empty vector) or pK3-CsrB1, expressing CsrB from a constitutive promoter. Expression of *hilD*, *hilA* and *ssaG* was restored in the $\Delta sirA$ mutant, but not in the $\Delta hilD$ mutant, in the presence of pK3-CsrB1 (Fig. 6). In agreement with the notion that SirA controls the expression of *hilD* and, as a consequence, of the SPI-1 and SPI-2 genes through CsrB/C, a plasmid expressing SirA was not able to restore the secretion of the SPI-1-encoded proteins (Fig. 7, upper), or the expression of the SPI-2-encoded SseB protein (Fig. 7, lower), in a $\Delta sirA \Delta csrB \Delta csrC$ triple mutant. In contrast, SPI-1-mediated protein secretion and the expression of SseB, were restored by a plasmid expressing HilD in this triple mutant (Fig. 7). Taken together, these results support the model in which SirA indirectly regulates *hilD* expression, and thus the SPI-1 and SPI-2 genes, by directly activating transcription of *csrB* and *csrC*.

CsrA represses expression of *HilD* by binding to the *hilD* leader transcript

In *E. coli*, CsrB and CsrC regulate gene expression by binding to and sequestering the RNA binding protein CsrA, thus counteracting the negative post-transcriptional

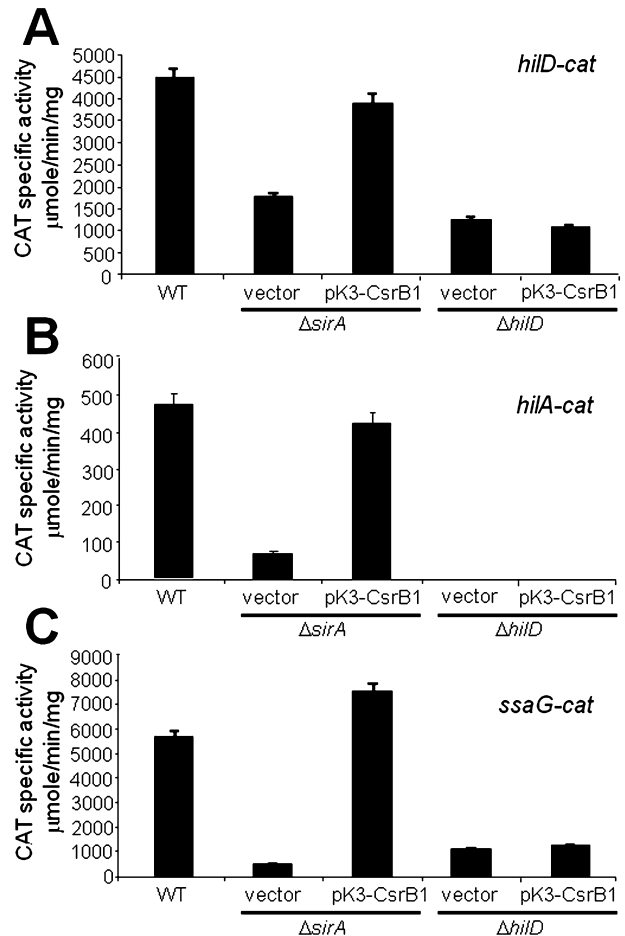


Fig. 6. The presence of CsrB restores the expression of *hilD*, *hilA* and *ssaG* in the absence of SirA but not in the absence of HilD. Expression of transcriptional fusions *hilD-cat* (A) *hilA-cat* (B) and *ssaG-cat* (C) contained in *phlD-cat1*, *phlA-cat1* and *pssaG-cat1*, respectively, was determined in WT and isogenic $\Delta sirA$ and $\Delta hilD$ strains containing vector pMPM-K3 or plasmid pK3-CsrB1, which expresses CsrB from a constitutive promoter. The CAT-specific activity was determined from samples collected from bacterial cultures grown for 5 h (for *hilD* and *hilA* fusions) or 10 h (for the *ssaG* fusion) in LB at 37°C. Data are the average of three independent experiments done in duplicate. Error bars represent the standard deviations.

control exerted by CsrA on its target mRNAs (Babitzke and Romeo, 2007; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008; Timmermans and Van Melderen, 2010). To evaluate the regulatory role of CsrA on the expression of the SPI-1 and SPI-2 genes, we first analysed the expression of these genes when CsrA is overexpressed. As CsrB and CsrC antagonize CsrA activity, the phenotypes associated with CsrA overexpression were predicted to mimic the phenotypes observed in the $\Delta csrB \Delta csrC$ double mutant strain. The transcriptional activity of the *hilD-cat*, *hilA-cat* and *ssrAB-cat*, as well as of the *sirA-cat*, *csrB-cat* and *csrC-cat* transcriptional fusions was determined in a WT strain containing plasmids pMPM-K3 (empty vector) or pK3-

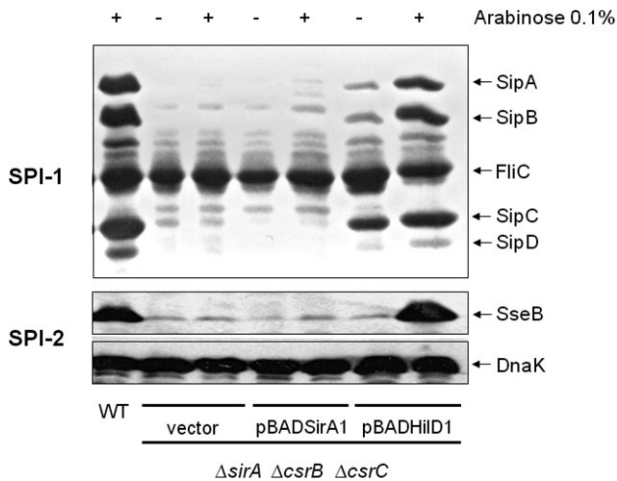


Fig. 7. SirA, but not HilD, requires the presence of CsrB and CsrC to induce secretion of SPI-1-encoded proteins and expression of the SPI-2 effector protein SseB. Secretion of the SPI-1-encoded proteins (upper) and expression of SseB (lower) was analysed in WT and *sirA::Tn10d $\Delta csrB \Delta csrC::kan$* triple mutant strains, containing vector pBADMyHisA, or plasmids pBAD-HilD1 or pBAD-SirA1, expressing HilD and SirA, respectively, from an arabinose-inducible promoter, as described in Fig. 5. 0.1% L-arabinose was added (+) to the medium for inducing expression of HilD and SirA.

CsrA1. Additionally, the level of the *hilD* mRNA was measured by q-RT-PCR and the expression of HilA-FLAG and SsrB-FLAG proteins was determined by Western blot, in these same genetic backgrounds. Overproduction of CsrA drastically reduced the expression of *hilD*, *hilA* and *ssrAB* (Fig. 8A, B and E); while the expression of *sirA*, *csrB* and *csrC* was not affected (Fig. 8C and D). Furthermore, the presence of pK3-CsrA1 drastically reduced the expression of HilA-FLAG and SsrB-FLAG, as well as the secretion of the SPI-1-encoded proteins in WT *S. Typhimurium* (Fig. 8F and data not shown).

To further confirm the role of CsrA, we analysed the expression of SPI-1 and SPI-2 genes in a *csrA* deletion mutant (Table 1) carrying the *hilD-cat*, *hilA-cat*, *ssrAB-cat*, *sirA-cat*, *csrB-cat* and *csrC-cat* reporter fusions. The level of the *hilD* mRNA was also measured by q-RT-PCR in this mutant. Consistent with the observed negative regulatory role of CsrA overexpression, expression of *hilD*, *hilA* and *ssrAB* significantly increased in the $\Delta csrA$ mutant (Fig. 8A, B and E), whereas the expression of the *sirA*, *csrB* and *csrC* was not affected (Fig. 8C and D).

In agreement with these results, it was previously shown that overproduction of CsrA reduced the expression of *hilD* and *hilA* (Altier *et al.*, 2000b). This study also reported the generation of a *csrA* mutant in *S. Typhimurium* strain 14028s, which surprisingly showed a reduction in the expression of SPI-1 genes; however, this mutant presented a severe growth defect, which may

have affected the growth phase-dependent induction of the SPI-1 genes. Our $\Delta csrA$ mutant showed a less severe growth defect, which was restored when CsrA was expressed *in trans* (Fig. S5). It remains to be seen if the different effects on growth and on the expression of SPI-1 and SPI-2 genes caused by the absence of CsrA could also be attributed to distinct features of the strains used, SL1344 (this study) and 14028s (Altier *et al.*, 2000b), or to random secondary suppressor mutations acquired as a consequence of eliminating a pleiotropic regulatory protein.

The results described above, indicating that SirA/BarA and CsrB/C activate expression of *hilA* and *ssrAB* through HilD, also suggested that CsrA could directly repress *hilD* expression. To test this possibility, we performed EMSAs to determine whether CsrA binds to *hilD*, *hilA*, *ssrAB* or *csrB* transcripts. The addition of 1 μ M CsrA led to reduced mobility of the *hilD*, *ssrAB* and *csrB* transcripts, indicating that CsrA bound to these RNAs (Fig. 9A). In contrast, CsrA did not bind to *hilA* RNA (Fig. 9A). We next performed experiments to determine the affinity of CsrA for *hilD*, *ssrAB* and *csrB* mRNAs. CsrA bound to the *hilD* transcript as a distinct band (Fig. 9B). A non-linear least-squares analysis of these data yielded an apparent K_d value of 5 nM CsrA for *hilD* mRNA. The specificity of CsrA–*hilD* RNA interaction was investigated by performing competition experiments with specific (*hilD*) and non-specific (*E. coli phoB*) unlabelled RNA competitors. Unlabelled *hilD* was an effective competitor, whereas *phoB* did not compete with the CsrA–*hilD* RNA interaction (Fig. 9B). These results establish that CsrA binds specifically to the *hilD* transcript. Similar binding experiments were performed with the *ssrAB* and *csrB* transcripts. The affinity of CsrA for *ssrAB* mRNA ($K_d = 340$ nM) was much lower than for *hilD*. In addition, while unlabelled *ssrAB* RNA was able to compete with the labelled transcript for CsrA binding, it did so poorly (Fig. 9C). As expected, CsrA bound specifically to *csrB* mRNA with high affinity ($K_d = 20$ pM). Moreover, multiple shifted species were observed (Fig. 9D). While the stoichiometry of the shifted complexes was not examined, the first shifted species likely contain one CsrA dimer bound per transcript, with the slower migrating species containing multiple CsrA molecules bound to each transcript.

Footprint experiments were then performed to identify the CsrA binding site(s) in the *hilD* and *ssrAB* transcripts using RNase T1 as a probe (cleaves following single-stranded G residues). CsrA protected five G residues in the *hilD* transcript that overlapped the *hilD* SD sequence and translation initiation codon (Fig. 9E). As both of these regions contain the highly conserved GGA motif (Fig. 9E), it is apparent that CsrA binds to two sites in this transcript. These results indicate that CsrA represses *hilD* expression, presumably by blocking 30S ribosomal subunit

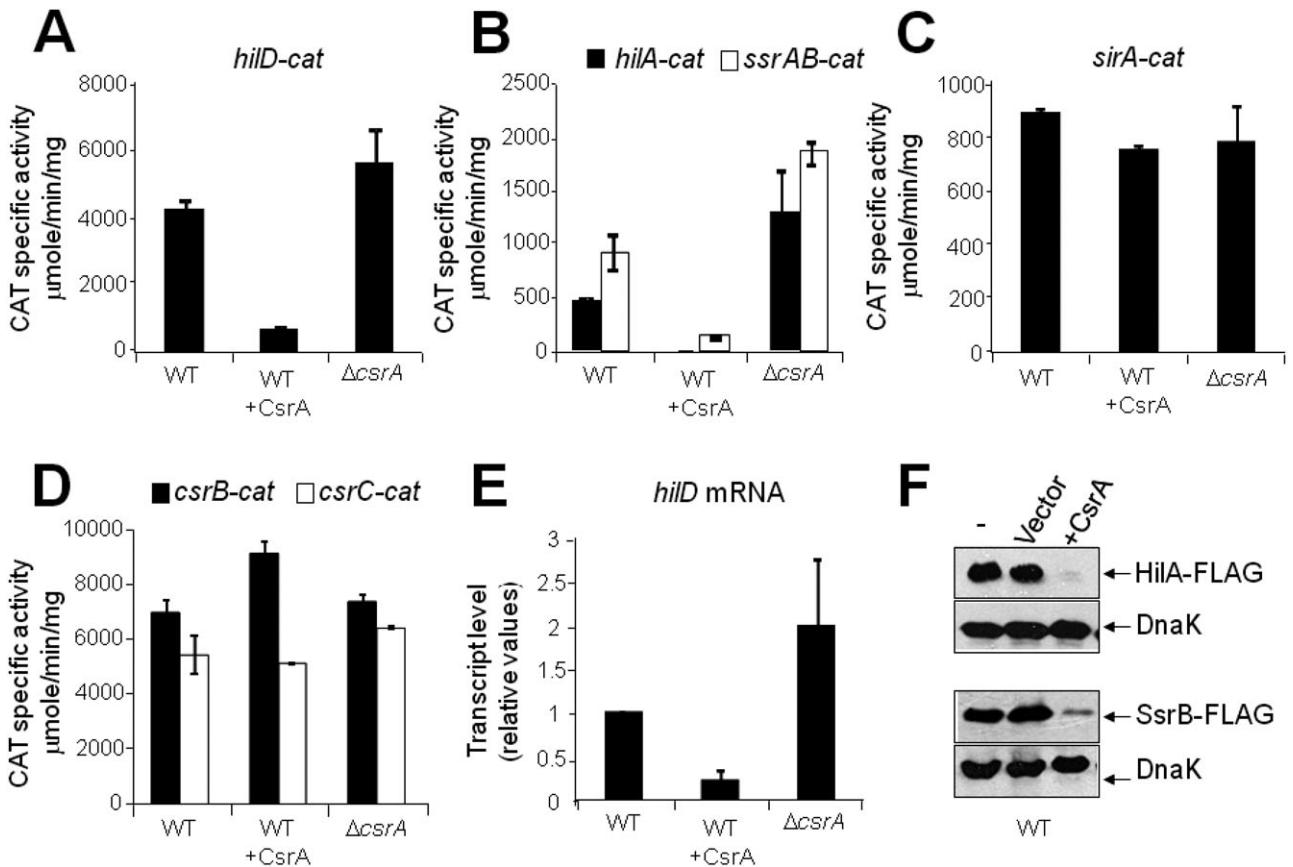


Fig. 8. CsrA negatively regulates expression of *hilD*, *hilA* and *ssrAB*. Expression of transcriptional fusions *hilD*-cat (A), *hilA*-cat and *ssrAB*-cat (B), *sirA*-cat (C), and *csrB*-cat and *csrC*-cat (D) contained in plasmids *philD*-cat1, *philA*-cat1, *pssrAB*-cat1, *psirA*-cat1, *pcsrB*-cat1 and *pcsrC*-cat1, respectively, was determined in WT and Δ*csrA* strains carrying vector pMPM-K3 or plasmid pK3-CsrA1, expressing CsrA from a constitutive promoter. CAT-specific activity was determined from samples of bacterial cultures grown in LB for 5 h (for *hilD*, *hilA*, *sirA*, *csrB* and *csrC* fusions) or 10 h (for the *ssrAB* fusion) at 37°C. The data are the average of three independent experiments done in duplicate. Error bars represent the standard deviations. The level of the *hilD* mRNA (E) was quantified by q-RT-PCR in WT *S. Typhimurium* and its Δ*csrA* mutant carrying plasmids pMPM-K3 (vector) or plasmid pK3-CsrA1, as described in Fig. 3. Expression of HilA and SsrB in WT *S. Typhimurium* carrying chromosomal FLAG-tagged *ssrB* or *hilA* genes and containing plasmids pMPM-T3 (vector) or plasmid pT3-CsrA expressing CsrA from a constitutive promoter, was analysed by Western blot (F), as described in Fig. 2.

Fig. 9. CsrA interaction with the *hilD* mRNA.

A. EMSAs of CsrA with *hilA*, *hilD*, *ssrAB* or *csrB* RNA. 5'-end-labelled RNA (250 pM) of each gene was incubated in the absence (-) or presence (+) of 1 μM CsrA.

B. Determination of the apparent equilibrium binding constant (K_d) of CsrA-*hilD* RNA interaction. 5'-end-labelled *hilD* RNA (100 pM) was incubated with the concentration of CsrA shown at the bottom of each lane. Positions of bound (B) and free (F) RNA are shown. For the competition assay, labelled *hilD* RNA (100 pM) was incubated with CsrA in the absence or presence of specific (*hilD*) or non-specific (*phoB*) competitor RNA.

C. Determination of the apparent K_d of CsrA-*ssrAB* RNA interaction. 5'-end-labelled *ssrAB* RNA (100 pM) was incubated with the concentration of CsrA shown at the bottom of each lane. Positions of bound (B) and free (F) RNA are shown. For the competition assay, labelled *ssrAB* RNA (100 pM) was incubated with CsrA in the absence or presence of specific (*ssrAB*) or non-specific (*phoB*) competitor RNA.

D. Determination of the apparent K_d of CsrA-*csrB* RNA interaction. 5'-end-labelled *csrB* RNA (10 pM) was incubated with the concentration of CsrA shown at the bottom of each lane. Positions of bound (B) and free (F) RNA are shown. For the competition assay, labelled *csrB* RNA (10 pM) was incubated with CsrA in the absence or presence of specific (*csrB*) or non-specific (*phoB*) competitor RNA.

E. CsrA-*hilD* RNA footprint analysis. 5'-end-labelled RNA was treated with RNase T₁ in the presence of the concentration of CsrA shown at the top of each lane. Partial alkaline hydrolysis (OH) and RNase T₁ digestion (T1) ladders, as well as a control lane in the absence of RNase T₁ treatment (C), are shown. RNase T₁ ladders were generated under denaturing conditions so that every G residue in the transcript could be visualized. Positions of the CsrA binding sites (BS), SD sequence and the translation initiation codon (Met) are indicated in the figure and in the *hilD* sequence at the bottom of Fig. 9E. Numbering is with respect to the start of transcription.

F. Northern blot analysis of *hilD* mRNA stability. WT and Δ*csrA* strains were grown in LB to mid-exponential phase of growth (OD₆₀₀ ~ 0.6), at which time transcription initiation was blocked by the addition of rifampicin. Samples were harvested at the indicated times, total RNA was prepared, and a 20 μg aliquot from each sample was analysed by Northern blotting as described in *Experimental procedures*. The left panel shows the autoradiogram of the blot with the specific *hilD* probe, and the ethidium bromide stained rRNA bands, showed as a loading control. The right panel shows the semi-logarithmic plot of the *hilD* mRNA decay in the two strains.

binding. CsrA also protected several G residues in the *ssrAB* transcript that overlapped its SD sequence (data not shown). Thus, it appears that CsrA is also capable of directly repressing *ssrAB* translation by binding to a single site in the *ssrAB* transcript, although the reduced affinity of CsrA for this RNA suggests that repression would be less extensive than for *hilD*.

By blocking ribosome binding and translation, CsrA-mediated translational repression often leads to accelerated degradation of target transcripts (Babitzke and Romeo, 2007; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008, Timmermans and Van Melderen, 2010). Therefore, we tested

whether bound CsrA accelerated *hilD* mRNA decay. The half-life of *hilD* mRNA was determined in WT and $\Delta csrA$ strains. To facilitate detection of *hilD* mRNA, the two strains were transformed with plasmid pT3-HilD1, which carries the *hilD* gene under the control of a constitutive promoter, to increase the cellular concentration of the *hilD* transcript. These strains were grown to mid-exponential phase in LB; then, transcription was inhibited by adding rifampicin. Culture samples were collected at different time points after addition of the drug for RNA extraction and analysis by Northern blotting. The *hilD* mRNA was detected as two unique bands, which showed similar

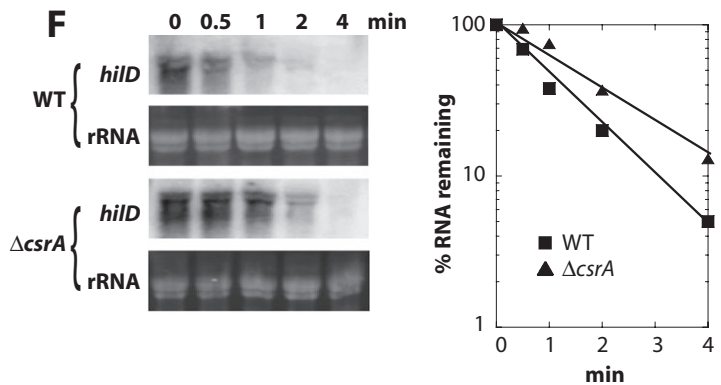
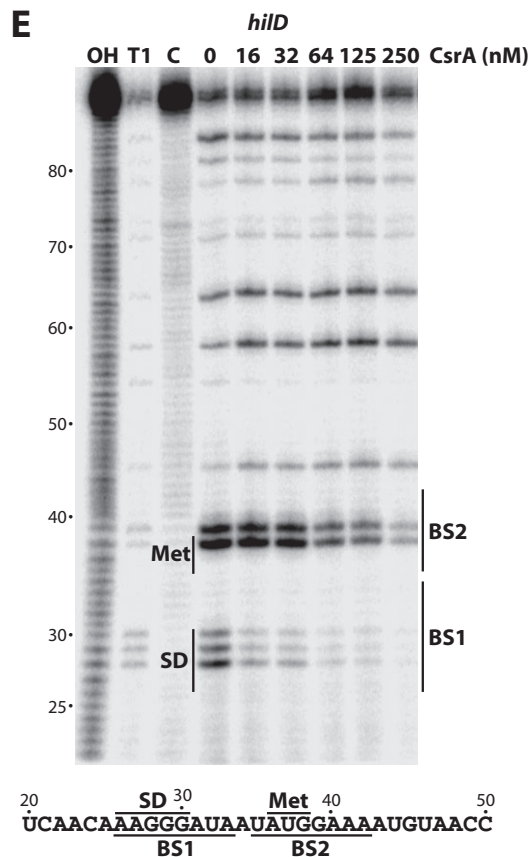
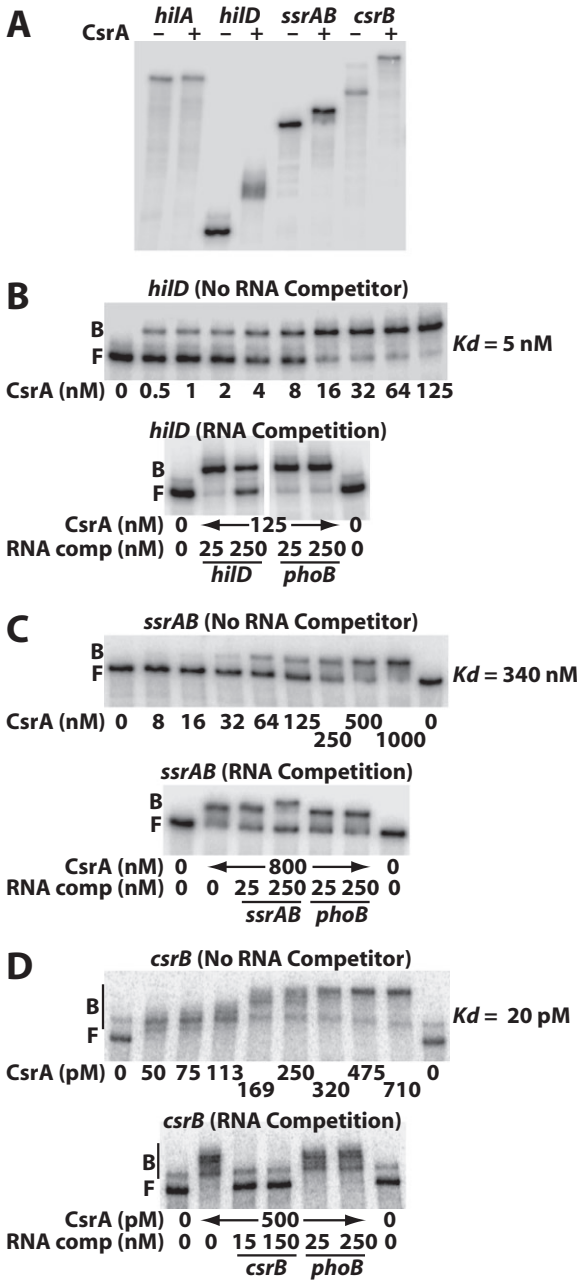


Table 1. Bacterial strains used in this study.

Strain	Genotype or description	Reference or source
<i>S. Typhimurium</i>		
SL1344	<i>xyl, hisG, rpsL, Sm^R</i>	Hoiseh and Stocker (1981)
MJW112	Δ <i>ssrB::kan</i>	M. Worley and F. Heffron
VV341	Δ <i>hilA::kan-339</i>	Bajaj <i>et al.</i> (1996)
JPTM3	Δ <i>ompR::kan</i>	Bustamante <i>et al.</i> (2008)
JPTM5	Δ <i>hilD::kan</i>	Bustamante <i>et al.</i> (2008)
JPTM6	Δ <i>hilC::kan</i>	Bustamante <i>et al.</i> (2008)
JPTM23	Δ <i>sirA::kan</i>	This study
JPTM24	Δ <i>hilA</i>	This study
JPTM25	Δ <i>hilD</i>	This study
JPTM26	Δ <i>hilC</i>	This study
JPTM27	Δ <i>sirA</i>	This study
JPTM28	Δ <i>ompR</i>	This study
JPTM29	Δ <i>ssrB</i>	This study
JPTM30	<i>ssrB::3XFLAG-kan</i>	This study
JPTM31	<i>ssrB::3XFLAG-kan</i> Δ <i>hilA</i>	This study
JPTM32	<i>ssrB::3XFLAG-kan</i> Δ <i>hilD</i>	This study
JPTM33	<i>ssrB::3XFLAG-kan</i> Δ <i>hilC</i>	This study
JPTM34	<i>ssrB::3XFLAG-kan</i> Δ <i>sirA</i>	This study
JPTM35	<i>ssrB::3XFLAG-kan</i> Δ <i>ompR</i>	This study
JPTM36	<i>hilA::3XFLAG-kan</i>	Bustamante <i>et al.</i> (2008)
JPTM37	<i>hilA::3XFLAG-kan</i> Δ <i>hilD</i>	This study
JPTM38	<i>hilA::3XFLAG-kan</i> Δ <i>sirA</i>	This study
JPTM39	Δ <i>barA::kan</i>	This study
JPTM40	Δ <i>csrB::kan</i>	This study
JPTM41	Δ <i>csrC::kan</i>	This study
JPTM42	Δ <i>csrB</i>	This study
JPTM43	Δ <i>csrB</i> Δ <i>csrC::kan</i>	This study
JPTM44	Δ <i>csrA::kan</i>	This study
CJO35	<i>sirA::Tn10d</i>	Johnston <i>et al.</i> (1996)
JPTM45	<i>sirA::Tn10d</i> Δ <i>csrB</i> Δ <i>csrC::kan</i>	This study
<i>E. coli</i>		
MC4100	Cloning strain, K12 derivative	Casadaban (1976)
BL21/pLys	Strain for expression of recombinant proteins	Invitrogen
DH10 β	Laboratory strain	Invitrogen
JPMC46	Δ <i>uvrY::kan</i>	This study
JPMC47	Δ <i>uvrY::</i>	This study

intensity in the WT and Δ *csrA* mutant strains immediately after the treatment with rifampicin (Fig. 9F). However, the *hilD* mRNA decayed faster in the WT strain (0.79 ± 0.05 min half-life) compared with the Δ *csrA* mutant (1.54 ± 0.05 min half-life) (Fig. 9F).

Taken together, it can be concluded that CsrA-mediated translational repression leads to more rapid degradation of *hilD* mRNA. In addition, by reducing HilD synthesis, CsrA would also affect HilD positive autoregulation (Olekhovich and Kadner, 2002; Ellermeier *et al.*, 2005), thus reducing *hilD* transcription. Furthermore, our results suggest that CsrA indirectly represses *hilA* and *ssrAB* transcription under growth conditions that favour HilD-dependent activation of the SPI-1 and SPI-2 regulons.

Discussion

In recent years it has become more evident that the mechanisms regulating virulence gene expression in *Salmonella* are more complex than previously thought. A

myriad of regulatory factors and environmental cues have been shown to be part of the molecular events leading to the appropriate spatiotemporal expression of the genes that integrate the SPI-1 and SPI-2 regulons (Altier, 2005; Jones, 2005; Ellermeier and Schlauch, 2007; Fass and Grosman, 2009). In this regard, we recently provided evidence showing that HilD is a key regulatory protein that establishes transcriptional cross-talk between the SPI-1 and SPI-2 regulons, by sequentially activating expression of the SPI-1 and SPI-2 genes when *Salmonella* grows in LB medium (Bustamante *et al.*, 2008). HilD directly binds to the regulatory regions of *hilA* and the *ssrAB* operon, thereby interfering with H-NS-mediated repression of their promoters. HilA and the SsrA/B two component system, in turn, activate the SPI-1 and SPI-2 regulons respectively (Schechter *et al.*, 2003; Olekhovich and Kadner, 2006; Bustamante *et al.*, 2008). Interestingly, HilD is not required for expression of the *ssrAB* operon when *Salmonella* grows in minimal media containing low concentrations of magnesium and phosphate (Bustamante *et al.*,

2008). Under these growth conditions *ssrAB* expression instead depends on other regulators such as OmpR, PhoP and SlyA (Lee *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2003; 2004; Bijlsma and Groisman, 2005; Linehan *et al.*, 2005; Fass and Groisman, 2009).

Based on previous knowledge (Johnston *et al.*, 1996; Ahmer *et al.*, 1999; Altier *et al.*, 2000a,b; Goodier and Ahmer, 2001; Lawhon *et al.*, 2003; Teplitski *et al.*, 2003; Fortune *et al.*, 2006; Teplitski *et al.*, 2006) and new information generated from this study, we present the integration of the regulatory cascade that controls expression of the SPI-1 and SPI-2 virulence regulons via the SirA/BarA and Csr global regulatory systems and the *Salmonella*-specific regulator HiiD.

First, we demonstrated that SirA positively controls expression of the SPI-1 and SPI-2 genes through HiiD. A previous study reported that SirA-His₆ bound to a region located downstream of the *hilA* promoter and the regulatory region of *hilC* (Teplitski *et al.*, 2003), suggesting a direct SirA regulation of these SPI-1 genes. In contrast, we found that MBP-SirA specifically bound to the regulatory regions of *csrB* and *csrC*, but not to the regulatory regions of *hilA* and *hilC* containing the fragments used by Teplitski *et al.* 2003 (Figs 4 and S3). Differences in these results could be attributed to different DNA binding specificities between SirA-His₆ and MBP-SirA, or other technical differences; however, the genetic evidence presented here supports the notion that SirA does not directly activate *hilA*. Briefly, we demonstrated that SirA cannot activate expression of SsrB and HiiA proteins in the absence of HiiD (Figs 2, S1 and S2), in agreement with results from a previous study (Ellermeier *et al.*, 2005). In contrast, HiiD activated expression of *ssrAB* and *hilA* in the absence of SirA, indicating that HiiD does not require the presence of SirA to directly activate expression of the SPI-1 and SPI-2 regulatory genes. In agreement with our results, mathematical models considering that SirA regulates SPI-1 genes through HiiD are able to predict results comparable with experimental data. However, they fail to predict the level of participation of intermediate components of the SPI-1 regulatory cascade, when considering a direct regulation of SirA on *hilA* or *hilC* (Ganesh *et al.*, 2009). Furthermore, CsrB was able to restore the expression of the SPI-1 and SPI-2 genes in the absence of SirA, but not in the absence of HiiD (Fig. 6), indicating that SirA acts through CsrB to regulate these genes, and that HiiD is downstream of SirA and CsrB in the regulatory cascade controlling them. This is consistent with previous studies indicating that SirA orthologues regulate gene expression through the corresponding CsrB and CsrC orthologues (Babitzke and Romeo, 2007; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008; Brencic *et al.*, 2009; Timmermans and Van Melderen, 2010). In this regard, we demonstrated that SirA

specifically binds to the *csrC* regulatory region (Fig. 4), an interaction previously demonstrated only for *csrB* (Teplitski *et al.*, 2003; Teplitski *et al.*, 2006). Moreover, the demonstration that CsrA binds to the SD sequence and translation initiation codon of *hiiD* mRNA, but not to *hilA* mRNA (Fig. 9), strongly correlates with the genetic and biochemical data indicating that regulation of the SPI-1 and SPI-2 regulons require direct activation of *csrB* and *csrC* by SirA, which in turn overcomes CsrA-dependent repression of HiiD synthesis. HiiD is then responsible for the direct activation of *hilA* and *ssrAB* and, indirectly, of the SPI-1 and SPI-2 regulons.

Additionally, we found that CsrA binds to *ssrAB* mRNA, but with a much lower affinity than to *hiiD* mRNA ($K_d = 340$ nM vs. 5 nM) (Fig. 9). Whether this weak CsrA-*ssrAB* RNA interaction is capable of regulating *ssrAB* expression remains to be determined. However, as expression of *ssrAB* requires HiiD when *Salmonella* grows in LB medium, CsrA-mediated regulation of HiiD synthesis appears to be the primary mechanism by which CsrA controls *ssrAB* expression. Moreover, SPI-2 expression was not significantly affected in the Δ *sirA* mutant growing in N-MM (Fig. 1), which favours HiiD-independent activation of *ssrAB*.

A model for the regulatory cascade that controls expression of the SPI-1 and SPI-2 regulons, which summarizes our results and those from other groups, is shown in Fig. 10. This regulatory cascade is under the influence of catabolite repression, through the positive control of SirA expression exerted by the cAMP receptor protein CRP (Teplitski *et al.*, 2006). The regulatory cascade can also be activated by short-chain fatty acids, such as acetate, formate and propionate, which stimulate the sensor kinase activity of BarA, and thus phosphorylation of SirA orthologues (Chavez *et al.*, 2010). Alternatively, acetyl-phosphate seems to directly phosphorylate the response regulator SirA or the sensor kinase BarA (Altier *et al.*, 2000a; Lawhon *et al.*, 2002; Teplitski *et al.*, 2003; 2006). Acetyl-phosphate can be generated from acetate, which is commonly found in the distal ileum of the mammalian intestines. Within the bacteria, acetate is converted to acetyl-phosphate by acetate kinase (*ackA*), and, presumably, can also be produced endogenously from acetyl-CoA by phosphotransacetylase (*pta*) (Lawhon *et al.*, 2002; Teplitski *et al.*, 2006). Phosphorylated SirA activates expression of CsrB and CsrC by binding to the *csrB* and *csrC* regulatory regions. These RNA molecules, in turn, bind to and sequester CsrA (Babitzke and Romeo, 2007; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008; Timmermans and Van Melderen, 2010), thus counteracting CsrA-mediated translational repression of *hiiD*. The appropriate concentration and activity of HiiD is maintained by additional negative and positive regulatory mechanisms, including degradation of HiiD mediated by the Lon protease (Bod-

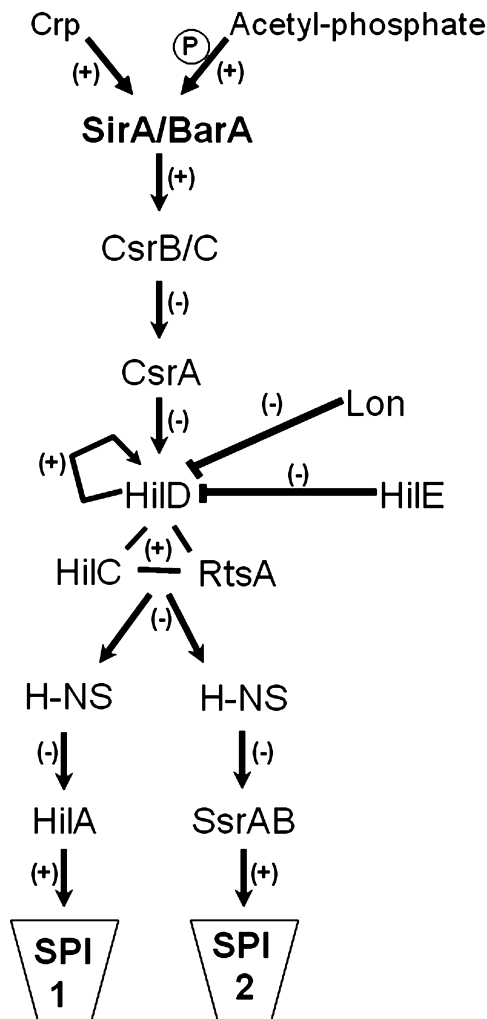


Fig. 10. Schematic representation of the SirA-CsrB/C-CsrA-HilD regulatory cascade controlling the expression of SPI-1 and SPI-2 genes in *S. Typhimurium*. See text for details.

dicker and Jones, 2004; Takaya *et al.*, 2005), HilD inactivation by direct interaction with HilE (Baxter *et al.*, 2003), positive autoregulation of HilD, as well as by a feed forward positive regulatory loop involving the HilD, HilC and RtsA AraC-like regulators (Olekhovich and Kadner, 2002; Ellermeier *et al.*, 2005). The regulatory cascade diverges when HilD, in a growth phase-dependent manner, activates expression of *hilA* and the *ssrAB* operon, by counteracting the repression exerted by H-NS on their promoters (Schechter *et al.*, 2003; Olekhovich and Kadner, 2006; Bustamante *et al.*, 2008). Finally, HilA and the SsrA/B system positively control expression of the SPI-1 and SPI-2 regulons respectively (Altier, 2005; Jones, 2005; Ellermeier and Schlauch, 2007; Fass and Groisman, 2009; Tomljenovic-Berube *et al.*, 2010).

The SirA-HilD divergent regulatory cascade could be important to co-ordinate the events leading to intestinal

infection by *Salmonella*. Different lines of evidence support the notion that both the SPI-1 and SPI-2 genes are required for the production of enteritis in animal models (Bispham *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005; Coburn *et al.*, 2005; Coombes *et al.*, 2005; Hapfelmeier *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2007; Haraga *et al.*, 2008). In addition, it was shown that SPI-2 genes are expressed in the intestine before epithelial cell invasion (Brown *et al.*, 2005). Moreover, previous studies indicate that SirA, CsrB/CsrC, CsrA and HilD are required by *Salmonella* to display phenotypic features involved in intestinal infection (Altier, 2005; Jones, 2005; Lucchetti-Miganeh *et al.*, 2008). Once *Salmonella* is inside host cells or growing in N-MM, SPI-2 genes, which are essential for the systemic phase of the infection (Cirillo *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 1998; Hansen-Wester and Hensel, 2001), are expressed by a SirA-Csr-HilD-independent mechanism involving other regulators such as OmpR, PhoP and SlyA (Fass and Groisman, 2009); whereas expression of the SPI-1 genes is rapidly downregulated following SPI-1-mediated invasion or when growing in N-MM (Eriksson *et al.*, 2003; Drecktrah *et al.*, 2006; Bustamante *et al.*, 2008). In this regard, it has also been shown that SPI-1 is not required for *Salmonella* replication inside host cells (Drecktrah *et al.*, 2006). These results suggest that the SirA-Csr-HilD regulatory cascade is not functional during the systemic phase of the infection. Therefore, although SirA has been shown to be required for *Salmonella* intracellular replication (Chan *et al.*, 2005), this does not seem to be related to the SirA-mediated regulation of the SPI-2 genes intracellularly, but instead of other target genes, in agreement with its global regulatory nature observed in *Salmonella* and other bacteria (Ahmer *et al.*, 1999; Goodier and Ahmer, 2001).

Our results together with those from other groups, illustrate how multiple global and *Salmonella*-specific regulators have been integrated to form a complex regulatory circuitry that allow the appropriate spatiotemporal expression of genes that have been acquired by horizontal transfer events. In addition, they further expand our understanding about the molecular mechanisms co-ordinating the expression of the SPI-1 and SPI-2 genes.

Experimental procedures

Bacterial strains, plasmids and primers used in this work are listed in Tables 1, 2 and S1 respectively.

Bacterial strains and growth conditions

Bacterial cultures were grown at 37°C in LB medium, containing 1% tryptone, 0.5% yeast agar and 1% NaCl, at pH 7.5; or in N-MM containing 5 mM KCl, 7.5 mM (NH₄)₂SO₄, 0.5 mM K₂SO₄, 1 mM KH₂PO₄, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 μM MgCl₂, 0.5% glycerol and 0.1% casamino acids. When nec-

Table 2. Plasmids used in this study.

Plasmid	Description	Reference or source
pKK232-8 philA-cat1	pBR322 derivative containing a promoterless chloramphenicol acetyltransferase (<i>cat</i>) gene, Ap ^R pKK232-8 derivative containing a <i>hilA-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -410 to +446	Brosius (1984) Bustamante <i>et al.</i> (2008)
philD-cat1	pKK232-8 derivative containing a <i>hilD-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -364 to +88	Bustamante <i>et al.</i> (2008)
pssaG-cat1	pKK232-8 derivative containing a <i>ssaG-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -232 to +361	Bustamante <i>et al.</i> (2008)
pssrAB-cat1	pKK232-8 derivative containing a <i>ssrB-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -303 to +3054	Bustamante <i>et al.</i> (2008)
psirA-cat1	pKK232-8 derivative containing a <i>sirA-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -563 to +98	This study
philC-cat1	pKK232-8 derivative containing a <i>hilC-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -373 to +79	This study
prtsA-cat1	pKK232-8 derivative containing a <i>rtsA-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -465 to +97	This study
pcsrB-cat1	pKK232-8 derivative containing a <i>csrB-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -372 to +18	This study
pcsrC-cat1	pKK232-8 derivative containing a <i>csrC-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -351 to +63	This study
pKD46	pINT-ts derivative containing red recombinase system under an arabinose-inducible promoter, Ap ^R	Datsenko and Wanner (2000)
pKD4	pANT _{Sy} derivative template plasmid containing the kanamycin cassette for λ Red recombination, Ap ^R	Datsenko and Wanner (2000)
pCP20	Plasmid expression FLP recombinase from a temperature-inducible promoter, Ap ^R	Datsenko and Wanner (2000)
pSUB11	pGP704 derivative template plasmid for FLAG epitope tagging	Uzzau <i>et al.</i> (2001)
pBADMycHisA	Expression vector for constructing C-terminal MycHis fusions, <i>ara</i> promoter, Ap ^R	Invitrogen
pBADMycHisC	Expression vector for constructing C-terminal MycHis fusions, <i>ara</i> promoter, Ap ^R	Invitrogen
pBAD-HilD1	pBADMycHis derivative expressing HilD-MycHis from the <i>ara</i> promoter	This study
pBAD-SirA1	pBADMycHis derivative expressing SirA-MycHis from the <i>ara</i> promoter	This study
pMPM-K3	p15A derivative low-copy-number cloning vector, <i>lac</i> promoter, Kan ^R	Mayer (1995)
pK3-SirA1	pMPM-K3 derivative expressing SirA from the <i>lac</i> promoter	This study
pK3-CsrB1	pMPM-K3 derivative expressing CsrB from the <i>lac</i> promoter	This study
pK3-CsrA1	pMPM-K3 derivative expressing CsrA from the <i>lac</i> promoter	This study
pMPM-T3	p15A derivative low-copy-number cloning vector, <i>lac</i> promoter, Tc ^R	Mayer (1995)
pT3-HilD1	pMPM-T3 derivative expressing HilD from the <i>lac</i> promoter	Bustamante <i>et al.</i> (2008)
pT3-CsrA1	pMPM-T3 derivative expressing CsrA from the <i>lac</i> promoter	This study
pMAL-c2X	Vector for constructing MBP fusions, Ap ^R	New England Biolabs
pMAL-SirA1	pMAL-c2X derivative expressing MBP-SirA	This study
pCSB12	pET21a+ derivative expressing CsrA-H6	Dubey <i>et al.</i> (2005)

The co-ordinates for the *cat* fusions are indicated with respect to the transcriptional start site for each gene.

essary, media were supplemented with the following antibiotics: ampicillin (200 µg ml⁻¹), streptomycin (100 µg ml⁻¹), tetracycline (10 µg ml⁻¹) or kanamycin (20 µg ml⁻¹). Bacterial cultures grown overnight in LB medium were concentrated and resuspended in fresh LB or N-MM to an OD₆₀₀ of 1. Then, 250 ml flasks containing 50 ml of LB or N-MM were inoculated with 1 ml of the bacterial suspensions and incubated at 37°C in a shaking water bath at 200 r.p.m. (Gyromax 902; Amerex Instruments). Culture samples for CAT activity determination or for Western blot analysis, were taken after 5 or 10 h of growth in LB under the conditions described above. These time points were previously optimized for the analysis of SPI-1 and SPI-2 regulation respectively (Bustamante *et al.*, 2008).

CAT assays

The CAT assays and protein quantification to calculate CAT-specific activities were performed as described previously (Puente *et al.*, 1996).

Construction of mutant strains and strains expressing FLAG-tagged proteins

Non-polar gene-deletion mutant strains (Table 1) were generated by the λRed recombinase system, as reported previously (Datsenko and Wanner, 2000). The genes *sirA*, *barA*, *csrB*, *csrC* or *csrA* were replaced with a selectable kanamycin resistance cassette in the *S. Typhimurium* SL1344 strain generating strains Δ*sirA*::*kan* (JPTM23), Δ*barA*::*kan* (JPTM39), Δ*csrB*::*kan* (JPTM40), Δ*csrC*::*kan* (JPTM41) and Δ*csrA*::*kan* (JPTM44) respectively. The gene *uvrY* was replaced with the kanamycin resistance cassette in *E. coli* MC4100 to generate the Δ*uvrY*::*kan* (JPMC46) strain. When required, the kanamycin resistance cassette was excised from the respective mutant strain, by using helper plasmid pCP20, expressing the FLP recombinase, as described previously (Datsenko and Wanner, 2000), generating *S. Typhimurium* mutant strains Δ*hilA* (JPTM24), Δ*hilD* (JPTM25), Δ*hilC* (JPTM26), Δ*sirA* (JPTM27), Δ*ompR* (JPTM28), Δ*ssrB* (JPTM29) and Δ*csrB* (JPTM42) and *E. coli* Δ*uvrY* (JPMC47). The Δ*csrB* Δ*csrC*::*kan* double mutant (JPTM43) was gener-

ated by introducing the $\Delta csrC::kan$ deletion into the $\Delta csrB$ mutant (JPTM42) by P22 transduction. The $sirA::Tn10d \Delta csrB \Delta csrC::kan$ triple mutant (JPTM45) was generated by introducing the $sirA::Tn10d$ deletion into the $\Delta csrB \Delta csrC::kan$ double mutant (JPTM43) by P22 transduction.

The chromosomal $ssrB$ gene was FLAG-tagged in *S. Typhimurium* SL1344, using a modification of the λ Red recombinase system for gene replacement, as described previously (Uzzau *et al.*, 2001), generating strain JPTM30. The $ssrB::3XFLAG-kan$ allele from strain JPTM30 was transferred to strains $\Delta hilA$ (JPTM24), $\Delta hilD$ (JPTM25), $\Delta hilC$ (JPTM26), $\Delta sirA$ (JPTM27) and $\Delta ompR$ (JPTM28) by P22 transduction, generating strains JPTM31, JPTM32, JPTM33, JPTM34 and JPTM35 respectively. The $hilA::3XFLAG-kan$ allele from strain JPTM36 was transferred to strains $\Delta hilD$ (JPTM25) and $\Delta sirA$ (JPTM27) by P22 transduction, generating strains JPTM37 and JPTM38 respectively. All mutant strains were verified by PCR amplification and sequencing.

SDS/PAGE and Western blot assays

Whole-cell extracts were prepared from bacterial samples collected at the indicated time points from LB cultures. Ten micrograms of each extract were subjected to electrophoresis in SDS-12% polyacrylamide gels, and then transferred to 0.45 μ m pore size nitrocellulose membranes (Bio-Rad), using a semidry transfer apparatus (Bio-Rad). The membranes containing the transferred proteins were blocked in 5% non-fat milk for 1 h. Immunoblots were performed with anti-FLAG M2 (Sigma) or anti-DnaK (StressGen) monoclonal antibodies, or anti-SseB polyclonal antibody (Coombes *et al.*, 2004), at 1:1000, 1:20 000 and 1:2000 dilutions respectively. Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit (Pierce), at a dilution of 1:10,000, were used as the secondary antibodies. Bands on the blotted membranes were developed by incubation with the Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer) and exposed to Kodak X-Omat films.

Protein secretion analysis

S. Typhimurium strains were grown for 9 h in LB. Then, 1.5 ml samples were harvested from each culture and concentrated by centrifugation for 5 min at 16 000 *g*. Proteins contained in culture supernatants were precipitated by the addition of 10% (v/v) trichloroacetic acid and overnight incubation at 4°C. Precipitated proteins were concentrated by centrifugation at 16 000 *g* for 30 min at 4°C. Pellets were resuspended in SDS-PAGE loading buffer containing 10% (v/v) saturated Tris base. Samples were subjected to SDS-PAGE analysis, using 12% polyacrylamide gels and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

DNA EMSAs

The regulatory regions of *hilD*, *hilC*, *csrB*, *csrC*, *hilA*, *ssrAB* and *sigD* were amplified by PCR using primer pairs *hilD*FBamHI/*hilD*RHindIII, *hilC*F5mal/*hilC*RSall, *csrB*-Fw1HindIII/*csrB*-Rev1, *csrC*-BFw1/*csrC*-HRv1, *hilA*1FBamHI/*hilA*2RHindIII, *ssaB*FBgIII/*ssrB*RS6E

(Bustamante *et al.*, 2008) and *sigDBH1F*/*sigDH3R*, respectively, and *S. Typhimurium* SL1344 chromosomal DNA as template. PCR products were labelled during the reaction using 32 P-5'-end-labelled primers and then purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen). DNA binding reactions were performed in binding buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 5% glycerol and 10 μ g ml⁻¹ BSA] by mixing \approx 100 ng of each PCR product with \approx 100 ng of the *sigD* fragment (negative control) and increasing concentrations of purified phosphorylated or non-phosphorylated MBP-SirA, in a total volume of 20 μ l. Phosphorylated MBP-SirA was generated by incubation with 100 mM acetyl phosphate (Sigma) for 180 min at room temperature, as previously reported (Kenney *et al.*, 1995). Protein-DNA binding reactions were incubated at room temperature for 20 min and then electrophoretically separated in 6% non-denaturing polyacrylamide gels in 0.5 \times Tris-borate-EDTA buffer at room temperature. The unlabelled DNA fragments were stained with ethidium bromide and visualized with an Alpha-Imager UV transilluminator (Alpha Innotech). The 32 P-5'-end-labelled DNA fragments were detected by exposing to Kodak X-Omat films.

Quantitative real-time RT-PCR (q-RT-PCR) assays

Total RNA of *S. Typhimurium* SL1344 and its isogenic mutants was purified from samples of cultures grown in LB medium at 37°C for 5 h, using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Chromosomal DNA was removed by incubating 2 μ g of RNA from each strain with DNase I (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized in a reaction containing 0.5 μ g of each DNase-treated-RNA and 5 pmol of primers *hilD*-RT-R (for *hilD*) and *dnaK*-RT-R (for *dnaK*), using the Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas). The obtained cDNA was used as template for real-time PCR assays, with 5 pmol of primer pairs for *hilD* or *dnaK* (*hilD*-RT-F/*hilD*-RT-R or *dnaK*-RT-F/*dnaK*-RT-R, respectively) and the SYBR Green PCR Master Mix (Perkin-Elmer/Applied Bio-systems). Real-time PCR reactions were performed with the ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Bio-systems) set in the standard run mode, and data collected using the Rotor Gene 6000 series software 1.7. Reaction conditions were 10 min at 95°C, and 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 60 s. The level of *dnaK* mRNA was used as an internal control to normalize the results obtained for the *hilD* mRNA. The quantification technique used to analyse data was the $2^{-\Delta \Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). All real-time PCR reactions were performed in triplicate and were repeated using RNA purified from three different bacterial cultures.

RNA EMSAs

Electrophoretic mobility shift assays followed published procedures (Baker *et al.*, 2007; Yakhnin *et al.*, 2007). His-tagged CsrA (CsrA-H6) from *E. coli* was purified as described previously (Dubey *et al.*, 2005). Note that the amino acid sequence of CsrA from *S. enterica* and *E. coli* are identical. RNA was synthesized *in vitro* using the RNA Maxx Transcription kit (Stratagene). PCR fragments used as templates in

transcription reactions contained a T7 promoter and *hila*, *hilD*, *ssrAB* or *csrB* sequences extending from +1 to +365, +1 to +89, +1 to +183 or +1 to +371 relative to the start of transcription respectively. Gel-purified RNA was 5'-end-labelled with [γ - 32 P]-ATP. RNA suspended in TE buffer was heated to 90°C for 1 min followed by slow cooling to room temperature. Binding reactions (10 μ l) contained 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 200 ng μ l⁻¹ yeast RNA, 0.2 mg ml⁻¹ BSA, 7.5% glycerol, 20 mM DTT, 10–500 pM RNA, CsrA-H6 (various concentrations) and 0.1 mg ml⁻¹ xylene cyanol. Competition assay mixtures also contained unlabelled competitor RNA. Reaction mixtures were incubated for 30 min at 37°C to allow CsrA-RNA complex formation. Samples were then fractionated through native 10% polyacrylamide gels using 0.5 \times TBE as the gel running buffer. Radioactive bands were visualized with a phosphorimager and quantified using ImageQuant 5.2 software. Apparent equilibrium binding constants (K_d) of CsrA-RNA interaction were calculated as described previously (Yakhnin *et al.*, 2000).

RNA footprint assays

RNA footprint assays followed published procedures (Baker *et al.*, 2007; Yakhnin *et al.*, 2007). Binding reactions (10 μ l) containing various concentrations of CsrA-H6 and 5 nM *hilD* or *ssrAB* RNA were otherwise identical to those described for the EMSAs. After the initial binding reaction, 0.03 U RNase T1 (Fermentas) was added to the reaction mixtures, and incubation was continued for 15 min at 37°C. Reactions were terminated by the addition of 10 μ l of gel loading buffer (0.37% EDTA, pH 8.0, 0.3% bromophenol blue and xylene cyanol in 95% formamide) and placed on ice. Partial alkaline hydrolysis and RNase T1 digestion ladders of each transcript were prepared as described previously (Bevilacqua and Bevilacqua, 1998). Samples were fractionated through standard 6% polyacrylamide sequencing gels. Radioactive bands were visualized with a phosphorimager.

RNA extraction, Northern blot and half-life determination

To determine *hilD* mRNA half-lives, *S. Typhimurium* WT and Δ *csrA* mutant strains containing plasmid pT3-HilD1 were grown in LB to an OD₆₀₀ ~0.6, at which time 200 μ g ml⁻¹ rifampicin was added to the cultures to prevent transcription initiation. Total RNA was purified from samples taken at 0, 0.5, 1, 2 and 4 min after rifampicin addition by the hot phenol extraction method, as described previously (Georgellis *et al.*, 1992).

Northern blot analysis was performed by fractionation of the purified RNA samples (20 μ g) on a 1% agarose-formaldehyde gel, which were then transferred to a nitrocellulose membrane by capillary transfer. Membranes were cross-linked using a cross-linking device (Stratalinker, Stratagene), and prehybridized for 3 h at 42°C in a buffer containing 5 \times Denhardt's solution, 5 \times SSC, 0.2% SDS, 50% formamide and 250 μ g of sheared salmon sperm DNA per ml. Subsequently, a radio-labelled *hilD* specific DNA probe, denatured at 90°C for 5 min, was added to the prehybridization buffer and the membranes were incubated at 42°C

overnight. The *hilD* specific probe was obtained by digesting plasmid pT3-HilD1 with Sall and BamHI, separation of the fragments on agarose gels and purification of the *hilD* specific band by using the Qiagen Agarose Purification Kit. Probe labelling was performed by using [α - 32 P]dCTP and the Rediprime II Kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Membranes were washed twice with 50 ml of SSC 2 \times and SDS 0.1% at 42°C, and twice with SSC 0.2 \times and SDS 0.1% at 42°C. Images were obtained using the phosphorimager screens and analysed using the Typhoon image scanner (Amersham). Determination of the *hilD* mRNA half-life was performed as previously described (Von Gabain *et al.*, 1983).

Construction of plasmids and Expression and purification of MBP-SirA sections are described in *Experimental procedures in Supporting information*.

Acknowledgements

We thank A. Vázquez and F.J. Santana for technical assistance, E. Calva for critical reading of the manuscript, S. Miller and F. Heffron for providing *Salmonella* strains, and B.B. Finlay for providing the anti-SseB polyclonal antibody. This work was supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) (IN227306-3 and IN210309-3 to V.H.B., IN224107-3 to J.L.P., and IN219709-3 to D.G.), from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (83277 to V.H.B and 6079 to J.L.P.), and from the National Institutes of Health (Public Health Service grant GM059969 to P.B.), and from the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) (CRP/MEX08-02) (to D.G.). L.C.M is supported by a pre-doctoral fellowship from CONACYT (No. 169380).

References

- Ahmer, B.M., van Reeuwijk, J., Watson, P.R., Wallis, T.S., and Heffron, F. (1999) *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Mol Microbiol* **31**: 971–982.
- Altier, C. (2005) Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* **43** (Spec No): 85–92.
- Altier, C., Suyemoto, M., Ruiz, A.I., Burnham, K.D., and Maurer, R. (2000a) Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Mol Microbiol* **35**: 635–646.
- Altier, C., Suyemoto, M., and Lawhon, S.D. (2000b) Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion genes by CsrA. *Infect Immun* **68**: 6790–6797.
- Babitzke, P., and Romeo, T. (2007) CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol* **10**: 156–163.
- Bajaj, V., Lucas, R.L., Hwang, C., and Lee, C.A. (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.
- Baker, C.S., Morozov, I., Suzuki, K., Romeo, T., and Babitzke, P. (2002) CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**: 1599–1610.

- Baker, C.S., Eory, L.A., Yakhnin, H., Mercante, J., Romeo, T., and Babitzke, P. (2007) CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli* *hfq* by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence. *J Bacteriol* **189**: 5472–5481.
- Baxter, M.A., Fahlen, T.F., Wilson, R.L., and Jones, B.D. (2003) HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect Immun* **71**: 1295–1305.
- Bevilacqua, J.M., and Bevilacqua, P.C. (1998) Thermodynamic analysis of an RNA combinatorial library contained in a short hairpin. *Biochemistry* **37**: 15877–15884.
- Bijlsma, J.J., and Groisman, E.A. (2005) The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **57**: 85–96.
- Bispham, J., Tripathi, B.N., Watson, P.R., and Wallis, T.S. (2001) *Salmonella* pathogenicity island 2 influences both systemic salmonellosis and *Salmonella*-induced enteritis in calves. *Infect Immun* **69**: 367–377.
- Boddicker, J.D., and Jones, B.D. (2004) Lon protease activity causes down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells. *Infect Immun* **72**: 2002–2013.
- Brencic, A., McFarland, K.A., McManus, H.R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S.L., and Lory, S. (2009) The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol Microbiol* **73**: 434–445.
- Brosius, J. (1984) Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene* **27**: 151–160.
- Brown, N.F., Vallance, B.A., Coombes, B.K., Valdez, Y., Coburn, B.A., and Finlay, B.B. (2005) *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS Pathog* **1**: e32.
- Bustamante, V.H., Martínez, L.C., Santana, F.J., Knodler, L.A., Steele-Mortimer, O., and Puentes, J.L. (2008) HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 14591–14596.
- Casadaban, M.J. (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**: 541–555.
- Chan, K., Kim, C.C., and Falkow, S. (2005) Microarray-based detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium transposon mutants that cannot survive in macrophages and mice. *Infect Immun* **73**: 5438–5449.
- Chavez, R.G., Alvarez, A.F., Romeo, T., and Georgellis, D. (2010) The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J Bacteriol* **192**: 2009–2012.
- Cirillo, D.M., Valdivia, R.H., Monack, D.M., and Falkow, S. (1998) Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* **30**: 175–188.
- Coburn, B., Li, Y., Owen, D., Vallance, B.A., and Finlay, B.B. (2005) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* **73**: 3219–3227.
- Coombes, B.K., Brown, N.F., Valdez, Y., Brumell, J.H., and Finlay, B.B. (2004) Expression and secretion of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL. *J Biol Chem* **279**: 49804–49815.
- Coombes, B.K., Coburn, B.A., Potter, A.A., Gomis, S., Mirakhor, K., Li, Y., and Finlay, B.B. (2005) Analysis of the contribution of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine ileal loop model and a murine model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* **73**: 7161–7169.
- Darwin, K.H., and Miller, V.L. (1999) InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**: 4949–4954.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6640–6645.
- De Keersmaecker, S.C., Marchal, K., Verhoeven, T.L., Engelen, K., Vanderleyden, J., and Detweiler, C.S. (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., Nikolaus, T., Erdogan, S., and Hensel, M. (1999) Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol* **31**: 1759–1773.
- Drecktrah, D., Knodler, L.A., Ireland, R., and Steele-Mortimer, O. (2006) The mechanism of *Salmonella* entry determines the vacuolar environment and intracellular gene expression. *Traffic* **7**: 39–51.
- Dubey, A.K., Baker, C.S., Romeo, T., and Babitzke, P. (2005) RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA* **11**: 1579–1587.
- Eichelberg, K., and Galan, J.E. (1999) Differential regulation of *Salmonella typhimurium* type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-encoded transcriptional activators InvF and HilA. *Infect Immun* **67**: 4099–4105.
- Ellermeier, C.D., Ellermeier, J.R., and Slauch, J.M. (2005) HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **57**: 691–705.
- Ellermeier, J.R., and Slauch, J.M. (2007) Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol* **10**: 24–29.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M., and Hinton, J.C. (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **47**: 103–118.
- Fass, E., and Groisman, E.A. (2009) Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol* **12**: 199–204.
- Feng, X., Oropeza, R., and Kenney, L.J. (2003) Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **48**: 1131–1143.
- Feng, X., Walthers, D., Oropeza, R., and Kenney, L.J. (2004) The response regulator SsrB activates transcription and binds to a region overlapping OmpR binding sites at *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **54**: 823–835.

- Fortune, D.R., Suyemoto, M., and Altier, C. (2006) Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **74**: 331–339.
- Ganesh, A.B., Rajasingh, H., and Mande, S.S. (2009) Mathematical modeling of regulation of type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by SirA. *In Silico Biol* **9**: S57–S72.
- Georgellis, D., Arvidson, S., and von Gabain, A. (1992) Decay of *ompA* mRNA and processing of 9S RNA are immediately affected by shifts in growth rate, but in opposite manners. *J Bacteriol* **174**: 5382–5390.
- Gerlach, R.G., Jackel, D., Geymeier, N., and Hensel, M. (2007) *Salmonella* pathogenicity island 4-mediated adhesion is coregulated with invasion genes in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **75**: 4697–4709.
- Goodier, R.I., and Ahmer, B.M. (2001) SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol* **183**: 2249–2258.
- Groisman, E.A., and Ochman, H. (1997) How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* **5**: 343–349.
- Hansen-Wester, I., and Hensel, M. (2001) *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* **3**: 549–559.
- Hapfelmeier, S., Stecher, B., Barthel, M., Kremer, M., Müller, A.J., Heikenwalder, M., *et al.* (2005) The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar Typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* **174**: 1675–1685.
- Haraga, A., Ohlson, M.B., and Miller, S.I. (2008) *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* **6**: 53–66.
- Hensel, M. (2000) *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **36**: 1015–1023.
- Hensel, M., Shea, J.E., Waterman, S.R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., *et al.* (1998) Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* **30**: 163–174.
- Hoiseth, S.K., and Stocker, B.A. (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**: 238–239.
- Johnston, C., Pegues, D.A., Hueck, C.J., Lee, A., and Miller, S.I. (1996) Transcriptional activation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily. *Mol Microbiol* **22**: 715–727.
- Jones, B.D. (2005) *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *J Microbiol* **43** (Spec No): 110–117.
- Jones, M.A., Hulme, S.D., Barrow, P.A., and Wigley, P. (2007) The *Salmonella* pathogenicity island 1 and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken. *Avian Pathol* **36**: 199–203.
- Kenney, L.J., Bauer, M.D., and Silhavy, T.J. (1995) Phosphorylation-dependent conformational changes in OmpR, an osmoregulatory DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8866–8870.
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F.H., and Haas, D. (2008) Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol* **67**: 241–253.
- Lawhon, S.D., Maurer, R., Suyemoto, M., and Altier, C. (2002) Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol* **46**: 1451–1464.
- Lawhon, S.D., Frye, J.G., Suyemoto, M., Porwollik, S., McClelland, M., and Altier, C. (2003) Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **48**: 1633–1645.
- Lee, A.K., Detweiler, C.S., and Falkow, S. (2000) OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* **182**: 771–781.
- Linehan, S.A., Rytkonen, A., Yu, X.J., Liu, M., and Holden, D.W. (2005) SlyA regulates function of *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) and expression of SPI-2-associated genes. *Infect Immun* **73**: 4354–4362.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Lostroh, C.P., and Lee, C.A. (2001) The HilA box and sequences outside it determine the magnitude of HilA-dependent activation of P_{prgH} from *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol* **183**: 4876–4885.
- Lostroh, C.P., Bajaj, V., and Lee, C.A. (2000) The *cis* requirements for transcriptional activation by HilA, a virulence determinant encoded on SPI-1. *Mol Microbiol* **37**: 300–315.
- Lucas, R.L., and Lee, C.A. (2001) Roles of *hilC* and *hilD* in regulation of *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **183**: 2733–2745.
- Lucchetti-Miganeh, C., Burrowes, E., Baysse, C., and Ermel, G. (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* **154**: 16–29.
- Lundberg, U., Vinatzer, U., Berdnik, D., von Gabain, A., and Baccarini, M. (1999) Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol* **181**: 3433–3437.
- Marcus, S.L., Brumell, J.H., Pfeifer, C.G., and Finlay, B.B. (2000) *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* **2**: 145–156.
- Mayer, M.P. (1995) A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**: 41–46.
- Miao, E.A., and Miller, S.I. (2000) A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7539–7544.
- Mizusaki, H., Takaya, A., Yamamoto, T., and Aizawa, S. (2008) Signal pathway in salt-activated expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **190**: 4624–4631.
- Ochman, H., Lawrence, J.G., and Groisman, E.A. (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299–304.
- Ohl, M.E., and Miller, S.I. (2001) *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med* **52**: 259–274.

- Olekhovich, I.N., and Kadner, R.J. (2002) DNA-binding activities of the HilC and HilD virulence regulatory proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**: 4148–4160.
- Olekhovich, I.N., and Kadner, R.J. (2006) Crucial roles of both flanking sequences in silencing of the *hilA* promoter in *Salmonella enterica*. *J Mol Biol* **357**: 373–386.
- Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W., and Schoolnik, G.K. (1996) The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* **20**: 87–100.
- Santos, R.L., Tsois, R.M., Baumler, A.J., and Adams, L.G. (2003) Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. *Braz J Med Biol Res* **36**: 3–12.
- Schechter, L.M., and Lee, C.A. (2001) AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella typhimurium hilA* promoter. *Mol Microbiol* **40**: 1289–1299.
- Schechter, L.M., Damrauer, S.M., and Lee, C.A. (1999) Two AraC/XylS family members can independently counteract the effect of repressing sequences upstream of the *hilA* promoter. *Mol Microbiol* **32**: 629–642.
- Schechter, L.M., Jain, S., Akbar, S., and Lee, C.A. (2003) The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU, and Fis affect *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **71**: 5432–5435.
- Schmidt, H., and Hensel, M. (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **17**: 14–56.
- Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A.K., Meleforts, O., Georgellis, D., et al. (2002) Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 5130–5140.
- Takaya, A., Kubota, Y., Isogai, E., and Yamamoto, T. (2005) Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads to downregulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Mol Microbiol* **55**: 839–852.
- Teplitski, M., Goodier, R.I., and Ahmer, B.M. (2003) Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J Bacteriol* **185**: 7257–7265.
- Teplitski, M., Goodier, R.I., and Ahmer, B.M. (2006) Catabolite repression of the SirA regulatory cascade in *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* **296**: 449–466.
- Timmermans, J., and Van Melderen, L. (2010) Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell Mol Life Sci* **67**: 2897–2908.
- Tomljenovic-Berube, A.M., Mulder, D.T., Whiteside, M.D., Brinkman, F.S.L., and Coombes, B.K. (2010) Identification of the regulatory logic controlling *Salmonella* pathoadaptation by the SsrA-SsrB two-component system. *PLoS Genet* **6**: e1000875.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., and Bossi, L. (2001) Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 15264–15269.
- Von Gabain, A., Belasco, J.G., Schottel, J.L., Chang, A.C.Y., and Cohen, S.N. (1983) Decay of mRNA in *Escherichia coli*: investigation of the fate of specific segments of transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 653–657.
- Walthers, D., Carroll, R.K., Navarre, W.W., Libby, S.J., Fang, F.C., and Kenney, L.J. (2007) The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol* **65**: 477–493.
- Walthers, D., Li, Y., Liu, Y., Anand, G., Yan, J., and Kenney, L.J. (2011) *Salmonella enterica* response regulator SsrB relieves H-NS silencing by displacing H-NS bound in polymerization mode and directly activates transcription. *J Biol Chem* **286**: 1895–1902.
- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A.K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., et al. (2003) A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**: 657–670.
- Worley, M.J., Ching, K.H., and Heffron, F. (2000) *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Mol Microbiol* **36**: 749–761.
- Yakhnin, A.V., Trimble, J.J., Chiaro, C.R., and Babitzke, P. (2000) Effects of mutations in the L-tryptophan binding pocket of the Trp RNA-binding attenuation protein of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **275**: 4519–4524.
- Yakhnin, H., Pandit, P., Petty, T.J., Baker, C.S., Romeo, T., and Babitzke, P. (2007) CsrA of *Bacillus subtilis* regulates translation initiation of the gene encoding the flagellin protein (*hag*) by blocking ribosome binding. *Mol Microbiol* **64**: 1605–1620.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2

Víctor H. Bustamante*, Luay C. Martínez*, Francisco J. Santana*, Leigh A. Knodler†, Olivia Steele-Mortimer†, and José L. Puentes**

*Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico; and †Laboratory of Intracellular Parasites, Rocky Mountain Laboratories, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, 903 South 4th, Hamilton, MT 59840

Edited by Roy Curtiss, Arizona State University, Tempe, AZ, and accepted by the Editorial Board July 29, 2008 (received for review February 12, 2008)

The acquisition of new genetic traits by horizontal gene transfer and their incorporation into preexisting regulatory networks have been essential events in the evolution of bacterial pathogens. An example of successful assimilation of virulence traits is *Salmonella enterica*, which acquired, at distinct evolutionary times, *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1), required for efficient invasion of the intestinal epithelium and intestinal disease, and SPI-2, essential for *Salmonella* replication and survival within macrophages and the progression of a systemic infection. A positive regulatory cascade mainly composed of HilD, HilA, and InvF, encoded in SPI-1, controls the expression of SPI-1 genes, whereas the two-component regulatory system SsrA/B, encoded in SPI-2, controls expression of SPI-2 genes. In this study, we report a previously undescribed transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2, where the SPI-1–encoded regulator HilD is essential for the activation of both the SPI-1 and SPI-2 regulons but at different times during the stationary phase of growth in Luria-Bertani medium. Our data indicate that HilD counteracts the H-NS–mediated repression exerted on the OmpR-dependent activation of the *ssrAB* operon by specifically interacting with its regulatory region. In contrast, HilD is not required for SPI-2 regulon expression under the *in vitro* growth conditions that are thought to resemble the intracellular environment. Our results suggest that two independent SPI-2 activation pathways evolved to take advantage of the SPI-2–encoded information at different niches and, in consequence, in response to different growth conditions.

H-NS | OmpR | microbial pathogenesis | transcriptional regulation | salmonella

One of the major events in the evolution of pathogenic bacteria has been the horizontal transfer of large DNA fragments, which may encode for a wide variety of virulence factors (1, 2). Acquisition of pathogenicity islands is a dynamic process that can potentially compromise bacterial fitness if the expression of the newly acquired genes is not appropriately regulated by preexisting regulatory networks. Recent studies have shown that the histone-like protein H-NS has had an essential role in preventing the uncontrolled expression of A+T-rich genes contained within these incoming islands and in allowing the evolution of counteracting regulatory mechanisms to regulate the spatiotemporal expression of the gained genes (3–6). H-NS is a constitutive abundant protein, considered a global transcriptional regulator and a genome-structuring protein, which binds preferentially to A+T-rich sequences commonly present in horizontally transferred DNA (7, 8).

Salmonella enterica has evolved through the acquisition of several pathogenicity islands, two of which, *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-1 and SPI-2, encode type three secretion systems that are essential for virulence (9). These islands are functionally distinct because SPI-1 genes are required for efficient invasion of the intestinal epithelium, leading to gastroenteritis, whereas SPI-2 genes are essential for *Salmonella* repli-

cation and survival within macrophages and, as a consequence, for systemic disease (9).

With respect to SPI-1 and SPI-2 gene regulation, almost all studies have been carried out *in vitro* using well-defined synthetic growth media. Although it is clear that these systems do not reconstitute the *in vivo* environment, they have provided valuable insights into the complex regulatory networks involved in virulence gene expression. The synthetic media used to study SPI-1 and SPI-2 regulation are high-osmolarity and nutrient-rich media, such as Luria-Bertani (LB) broth (10, 11), and low-phosphate and low-magnesium minimal media, such as N-minimal medium (10, 12), respectively. Each of these media is believed to give some approximation of the appropriate *in vivo* environment; the intestinal lumen for SPI-1 and the intracellular *Salmonella*-containing vacuole for SPI-2. The SPI-1 regulon is controlled by a regulatory cascade composed mainly of the SPI-1–encoded regulators HilD, HilA, and InvF (13–16). SPI-2 genes are expressed when *Salmonella* is inside host cells (17–19) and is under the control of the SPI-2–encoded two-component system SsrA/B (12, 20, 21) [see supporting information (SI) Fig. S1 for details].

Here, we developed an *in vitro* system to study the sequential activation of SPI-1 and SPI-2 regulons in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*). Using this system, we were able to reveal a previously undescribed transcriptional cross-talk mechanism between SPI-1 and SPI-2, where the SPI-1–encoded regulator HilD differentially regulates, in a growth phase-dependent manner, both the SPI-1 and SPI-2 regulons during growth in LB medium. We show that HilD can bind directly to the regulatory region of the *ssrAB* operon and counteracts the repression exerted by H-NS on the OmpR- and growth phase-dependent expression of *ssrAB*. These results bring to light a new level of sophistication in the regulatory control of SPI-1 and SPI-2, which together form the cornerstone of *Salmonella* virulence. Additionally, the unveiling of a transcriptional link between a preexistent pathogenicity island and newly acquired genes highlights another important step in the evolution of pathogenic bacteria.

Results

Sequential Growth Phase-Dependent Expression of the SPI-1 and SPI-2 Regulons in LB. Initially, we studied the expression kinetics of *cat* transcriptional fusions to a number of *S. typhimurium* genes, including *sopB* and *pipB*, which belong to the SPI-1 and SPI-2

Author contributions: V.H.B. and J.L.P. designed research; V.H.B., L.C.M., F.J.S., and L.A.K. performed research; V.H.B., O.S.-M., and J.L.P. analyzed data; and V.H.B. and J.L.P. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: puentes@ibt.unam.mx.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0801205105/DCSupplemental.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

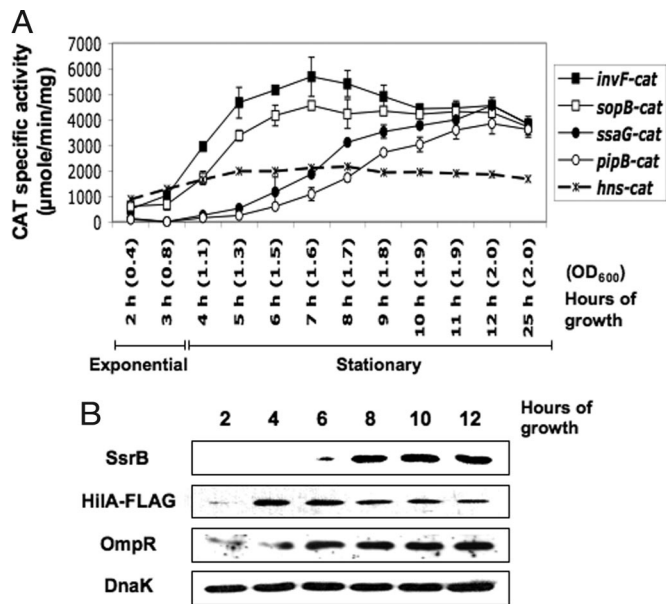


Fig. 1. The SPI-1 and SPI-2 regulons are expressed in LB in a growth phase-dependent manner. (A) Kinetics of expression of genes from SPI-1 (*invF* and *sopB*) and SPI-2 (*ssaG* and *pipB*) regulons as well as *hns* in LB cultures. Expression levels of *invF-cat*, *sopB-cat*, *ssaG-cat*, *pipB-cat*, and *hns-cat* transcriptional fusions were calculated by determining CAT-specific activity from samples taken hourly from LB cultures of *S. typhimurium* SL1344 carrying plasmid *pinvF-cat1*, *psopB-cat1*, *psaG-cat1*, *ppipB-cat1*, or *phns-cat1* (Table S1). The expression of the *hns-cat* fusion was analyzed as a control, which was not significantly altered along the growth curve. The data are the average of three different experiments done in duplicate. The OD₆₀₀ at each time point is indicated between parentheses. Growth phases are indicated by thin bars. (B) SsrB, HIIA, and OmpR production is also growth phase dependent. Immunoblots of whole-cell lysates of an *S. typhimurium* SL1344 strain carrying a chromosomal FLAG-tagged *hila* gene grown in LB medium were performed using a polyclonal anti-SsrB or anti-OmpR antibody or a monoclonal anti-FLAG antibody. Equivalent amounts of protein were analyzed for each time point. As a loading control, DnaK was detected using a monoclonal antibody.

regulons, respectively, but are physically located within SPI-5 (22). We found that both *sopB* and *pipB* were expressed in LB, a medium commonly used to study the expression of SPI-1 genes and not known to support SPI-2 expression (10, 11), but with different expression profiles. Whereas *sopB* expression is activated and maximal following entry into the stationary phase, activation of *pipB* was observed at later time points (Fig. 1A). To test if this sequential activation was a general feature of the SPI-1 and SPI-2 regulons, we also determined the activation kinetics in LB of *cat* transcriptional fusions to the SPI-1-encoded *invF* and the SPI-2-encoded *ssaG* genes, which followed the same pattern observed for *sopB* and *pipB*, respectively (Fig. 1A). In N-minimal medium, as expected, growth of *S. typhimurium* carrying these transcriptional fusions revealed the activation of *ssaG-cat* and *pipB-cat* (SPI-2 regulon fusions) but not the SPI-1 regulon genes *invF-cat* and *sopB-cat* (data not shown).

Because the two-component system SsrA/B is critical for the expression of the SPI-2 regulon in N-minimal medium (12, 20, 21), we next asked if it is also essential for expression of *ssaG* and *pipB* during the stationary phase in LB. Expression of the *ssaG* and *pipB* transcriptional fusions in a *ssrB::kan* strain was nearly abolished in either growth medium (Fig. 2A and B). In contrast, expression of *sopB* in LB broth was not affected by the absence of SsrB but was drastically reduced in the absence of HIIA (Fig. S2), the ToxR/OmpR-like protein that is pivotal for regulation of the SPI-1 regulon (13–15). To determine whether SsrB and HIIA expression in LB was also growth phase dependent, we

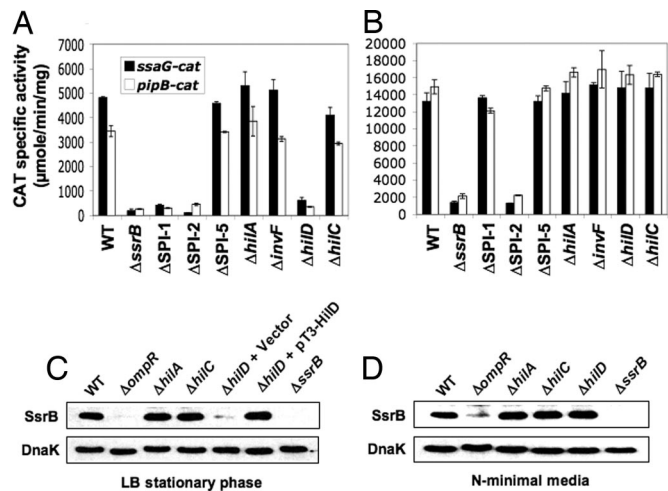


Fig. 2. HIIA is required for the stationary growth phase-dependent expression of SPI-2 regulon genes in LB but not in N-minimal medium. Expression of the *ssaG-cat* and *pipB-cat* transcriptional fusions was determined from samples taken from cultures of WT *S. typhimurium* and its Δ ssrB, Δ SPI-1, Δ SPI-2, Δ SPI-5, Δ hila, Δ invF, Δ hild, and Δ hiliC derivatives carrying plasmids *psaG-cat1* or *ppipB-cat1* grown for 12 h in LB medium (A) or for 16 h in N-minimal medium (B). The data are the average of three different experiments done in duplicate. SsrB in WT *S. typhimurium* and its Δ ompR, Δ hila, Δ hiliC, Δ hild, and Δ ssrB derivatives was analyzed by Western blotting using a polyclonal anti-SsrB antibody and whole-cell lysates prepared from samples taken from LB (C) or N-minimal medium (D) cultures at the same time points as in A and B, respectively. pT3-HiID (Table S1) was used to complement the Δ hild mutant.

performed Western blot analysis of whole-cell lysates of strain JPTM7 (*hila::3×FLAG-kan*) obtained from a time course of growth in LB. JPTM7 is a WT *S. typhimurium* SL1344 derivative expressing from its chromosomal gene location the HIIA protein tagged with a C-terminal 3×FLAG epitope (HIIA-FLAG), a feature that did not affect the expression of the SPI-1 or SPI-2 regulons (data not shown). SsrB was detected after 6 h of growth and was more evident toward the late stationary phase (Fig. 1B), which parallels the activation pattern of *ssaG* and *pipB* (Fig. 1A). Likewise, SsrA production was also growth phase dependent in LB (data not shown). In contrast, HIIA was detected after the first 2 h at the onset of the stationary phase, reaching maximal levels between 4 and 6 h and declining during the late stationary phase (Fig. 1B), resembling the expression patterns of *invF* and *sopB* (Fig. 1A). Therefore, the growth phase-dependent expression of SPI-1 and SPI-2 regulon genes can be attributed to mechanisms regulating the expression of their respective central regulators, HIIA and SsrB.

These results revealed that *Salmonella* senses two different environmental conditions during growth in LB, which allows the sequential activation of the SPI-1 and SPI-2 regulons at different stages during the stationary phase. Thus, the stationary phase of growth in LB offers a condition where the transcriptional transition between these two regulons can be analyzed (SPI-1 turning off and SPI-2 turning on).

The SPI-1-Encoded Regulator HIIA Also Regulates the SPI-2 Regulon.

To dissect the mechanism of activation of the SPI-2 regulon during the stationary phase in LB, we explored the potential role of the stationary phase σ factor RpoS as well as that of genes related to quorum sensing systems, such as *luxS*, which codes for the enzyme that generates an autoinducer 2-like signal, and *sdia*, which codes for a LuxR-like protein (23). Mutants lacking *rpoS*, *luxS*, or *sdia* showed no defect in SPI-2 gene expression (data not shown), indicating that regulatory proteins acting primarily in response to population density are not involved in this activation

pathway. Furthermore, acidic pH, believed to be a major inducing signal for SPI-2 expression in minimal medium and within the *Salmonella*-containing vacuole (12, 19, 21, 24–26) did not induce SPI-2; indeed, acidification of the medium had an adverse effect on SPI-2 expression (data not shown). We additionally showed that the stringent signal molecule ppGpp is required for the stationary phase induction of both the SPI-1 and SPI-2 regulons but does not control the transition from SPI-1 to SPI-2 expression in LB (SI Results and Fig. S3).

We next looked at the possible involvement of elements encoded within the SPI-1, SPI-2, and SPI-5 pathogenicity islands by analyzing the expression of the *ssaG-cat* and *pipB-cat* transcriptional fusions in *S. typhimurium* Δ SPI-1, Δ SPI-2, and Δ SPI-5 derivatives. As expected, expression of *ssaG-cat* and *pipB-cat* fusions in the Δ SPI-2 deletion mutant was drastically reduced during the stationary phase in LB; intriguingly, it was similarly reduced in the Δ SPI-1 deletion mutant but not in the Δ SPI-5 mutant (Fig. 2A). Thus, induction of the SPI-2 regulon during the stationary phase in LB requires an SPI-1–encoded factor. To determine if this involves any of the known SPI-1–encoded regulatory proteins, we next analyzed the expression of the *ssaG-cat* and *pipB-cat* transcriptional fusions in mutants lacking HilD (Δ *hilD*), HilC (Δ *hilC*), HilA (Δ *hilA*), or InvF (Δ *invF*). Interestingly, only the Δ *hilD* mutant showed reduced levels of expression of both fusions (Fig. 2A), and this was specific for these growth conditions because their expression was unaffected in the Δ *hilD* mutant following growth in N-minimal medium (Fig. 2B). As expected, expression of the SPI-1 regulon *sopB-cat* fusion was abolished in the Δ *hilD*, Δ *hilA*, and Δ *invF* mutants but was not affected in the Δ *hilC* and Δ *ssrB* mutants during growth in LB (Fig. S2).

To determine whether HilD regulates the SPI-2 regulon by controlling the expression of the two-component system SsrA/B, SsrA and SsrB protein levels were analyzed by immunoblotting of *Salmonella* lysates after growth in LB to the stationary phase. SsrB was detected directly using an anti-SsrB antibody, but an epitope tagged SsrA had to be constructed to assess SsrA expression. For this, the chromosomal *ssrA* gene was engineered to express a C-terminal 3 \times FLAG tag, generating strain JPTM9. This strain was then transferred by P22 transduction to Δ *ompR*, Δ *hilA*, Δ *hilC*, and Δ *hilD* deletion backgrounds, generating strains JPTM10, JPTM11, JPTM12, and JPTM13, respectively. SsrB levels in the Δ *hilA* and Δ *hilC* strains were similar to WT, but the SsrB level was barely detected in the Δ *hilD* mutant unless this strain was complemented with a plasmid expressing HilD (Fig. 2C). In contrast, SsrB production was not affected in the Δ *hilD* mutant when grown in N-minimal medium (Fig. 2D). These results confirm the role of HilD in the regulation of the SPI-2 regulon during growth in LB. Analysis of SsrA-FLAG levels gave similar results to SsrB (Fig. S4), indicating that HilD controls both the sensor kinase and the response regulator during the stationary phase of growth in LB cultures.

Several studies have addressed the role of the response regulators OmpR and PhoP in the expression of *ssrAB* and SPI-2 regulon genes in *Salmonella* grown in low Mg²⁺ minimal medium or within infected epithelial or macrophage cell lines (24, 27, 28). To assess the role of these regulators in the growth phase-dependent activation of SsrA and SsrB production in LB, their levels were analyzed by immunoblotting using total cell lysates of the Δ *ompR* and Δ *phoP* mutants grown in LB and in N-minimal medium. This analysis showed that OmpR but not PhoP was required for SsrA and SsrB expression under both growth conditions (Fig. 2 C and D, Fig. S4, and data not shown). Interestingly, OmpR also accumulated over time, reaching maximal levels during the late stationary phase in LB, as revealed by immunoblotting of samples from the time course of growth shown in Fig. 1B. This observation suggests that the specific HilD-dependent activation of SPI-2 expression in LB could, at

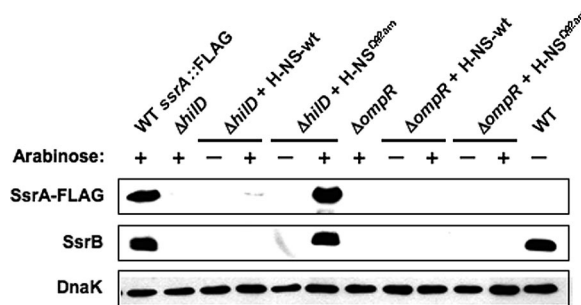


Fig. 3. HilD positively regulates *ssrA* and *ssrB* expression by counteracting H-NS. H-NS was inactivated in *S. typhimurium* *ssrA*::3 \times FLAG Δ *hilD*::*kan* and *ssrA*::3 \times FLAG Δ *ompR*::*kan* mutants by expressing a dominant-negative C-terminal truncated form of H-NS (see text). Plasmids pT6-HNS-WT and pT6-HNS-Q92am direct the expression of WT H-NS and H-NS^{Q92am}, respectively, from an arabinose-inducible promoter. Strains were grown in LB medium, with or without 0.1% arabinose. SsrA-FLAG and SsrB were detected by immunoblot analysis of whole-cell lysates using a monoclonal anti-FLAG antibody or polyclonal anti-SsrB antibodies. DnaK levels were also determined as a loading control using a monoclonal antibody.

least in part, be modulated by the growth phase-dependent expression of other essential regulatory proteins, such as OmpR.

HilD Counteracts the Repression Exerted by H-NS on *ssrAB*. HilD has been previously shown to regulate the expression of *hilA*, the gene coding for the central positive regulator of the SPI-1 regulon, positively by counteracting the H-NS–mediated repression on the *hilA* promoter (29, 30). Furthermore, it has also been shown that expression of the *ssrAB* genes is thermoregulated by H-NS (31). These results are consistent with two recent reports documenting the role of H-NS in silencing the expression of genes that have been acquired by *Salmonella* through horizontal gene transfer, such as those belonging to the SPI-1 and SPI-2 regulons (3, 4). Based on these antecedents, we next examined whether HilD induces expression of the SPI-2 regulon by counteracting H-NS repression. Because *Salmonella* lacking *hns* shows severe growth defects and seems to be viable only after acquiring secondary mutations (4), we used an H-NS mutant that does not have DNA-binding activity but still forms heterodimers with WT monomers, and thus acts as a dominant negative mutant (32, 33). Plasmids encoding WT H-NS (pT6-HNS-WT) or the H-NS/Q92am mutant (pT6-HNS-Q92am), a C-terminal truncated H-NS derivative corresponding to the N-terminal dimerization domain (H-NS^{Q92am}), under the control of an arabinose-inducible promoter, were transformed into strains *ssrA*::3 \times FLAG Δ *ompR*::*kan* (JPTM10) and *ssrA*::3 \times FLAG Δ *hilD*::*kan* (JPTM13), which were then grown in LB in the presence or absence of 0.1% arabinose. Total lysates prepared from samples collected during the stationary phase of growth in LB were subjected to immunoblotting using anti-FLAG and anti-SsrB antibodies. As shown in Fig. 3, SsrA-FLAG and SsrB were not detected in the Δ *hilD* strain carrying pT6-HNS-WT with or without arabinose; however, induction of the dominant-negative H-NS^{Q92am} from plasmid pT6-HNS-Q92am restored SsrA-FLAG and SsrB levels in the Δ *hilD* mutant. Interestingly, the H-NS^{Q92am} dominant negative did not restore SsrA-FLAG or SsrB production in the Δ *ompR* mutant (Fig. 3). These results indicated that HilD counteracts the H-NS–mediated repression on the *ssrAB* operon, subsequently allowing OmpR to activate transcription.

HilD and H-NS Directly Interact with the *ssrAB* Regulatory Region. Consistently with the coordinated production of both SsrA and SsrB described previously, we also found that the *ssrAB* genes are transcribed as an operon in an HilD- and OmpR-dependent

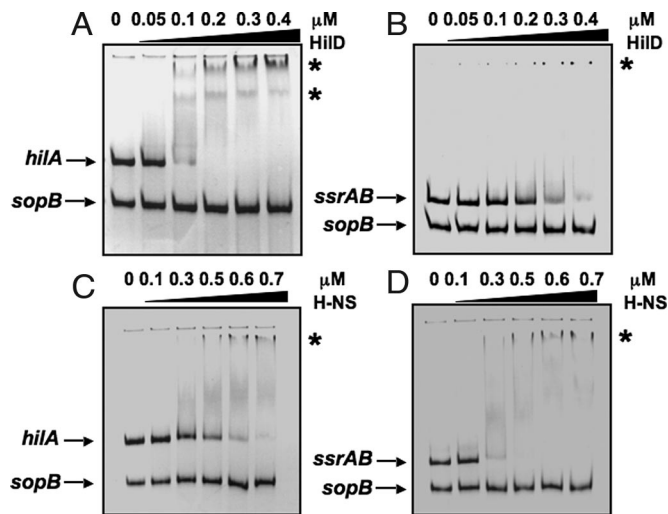


Fig. 4. HilD and H-NS directly interact with the *ssrAB* regulatory region. EMSAs were performed to analyze HilD and H-NS binding to the *ssrAB* and *hilA* regulatory regions. Fragments encompassing the regulatory regions of *hilA* (–410 to +446), *sopB* (–400 to +128) and *ssrAB* (–300 to +478), with respect to the corresponding transcriptional start sites, were incubated with increasing concentrations of affinity-purified MBP-HilD (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, and 0.4 μ M) or H-NS-His₆ (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.6, and 0.7 μ M). The DNA-protein complexes (indicated by an asterisk) were resolved in 6% polyacrylamide gels and stained with ethidium bromide. The *hilA* and *sopB* fragments were used as positive and negative controls, respectively.

manner from the promoter located upstream of *ssrA* (SI Results and Fig. S5). Having shown that HilD and H-NS regulate *ssrAB*, we next asked whether this is mediated by direct interaction of these proteins with the regulatory region of *ssrAB*, analogous to HilD and H-NS regulation of *hilA* (29, 30, 34). Affinity-purified maltose-binding protein (MBP)-HilD and H-NS-His₆ were then used to perform electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) with fragments encompassing different regulatory regions. In agreement with other reports (30, 34, 35), MBP-HilD shifted specifically DNA fragments containing the regulatory regions of *hilA* or *hilD* at a concentration of 0.1 μ M (Fig. 4A and Fig. S6A) but not those of the negative controls *sopB* (present in the same reaction) and *sirA* even at the highest concentration tested (0.4 μ M) (Fig. 4A and B and Fig. S6B), indicating that the purified MBP-HilD was functional *in vitro* and binds specifically. In agreement with our transcriptional fusion data showing its role as a positive regulator of the *ssrAB* operon, MBP-HilD also specifically shifted the *ssrAB* promoter fragment at concentrations ≥ 0.3 μ M (Fig. 4B). Therefore, HilD directly interacts with the regulatory region of the *ssrAB* operon. Likewise, H-NS-His₆ specifically bound to the fragments containing the *hilA* or *hilD* regulatory region (Fig. 4C and Fig. S6C) as well as to the *ssrAB* promoter fragment at concentrations ≥ 0.3 μ M (Fig. 4D), indicating that it directly silences this promoter.

Discussion

Acquisition of genomic DNA through horizontal gene transfer events could potentially impose a competitive disadvantage to the new bacterial host. Recent reports have highlighted the role that H-NS has played in bacterial evolution by silencing or downregulating, at the transcriptional level, the expression of foreign genes that have been acquired as a result of horizontal gene transfer events, thus preventing disadvantageous effects to the new bacterial host (3, 4, 6, 36). Bacterial pathogens such as *Salmonella* have evolved as a consequence of multiple horizontal gene transfer events at different evolutionary time points. Most of the genes acquired through these events are subjected to H-NS

silencing; thus, regulatory mechanisms that alleviate this repression also evolved to induce the expression of the gained genes at particular host niches (3, 4, 6, 36).

Recent observations have suggested that the expression of SPI-1 and SPI-2 genes and their role at distinct steps during the infection process are not as independent and niche restricted as previously thought. For example, SPI-1 genes have also been shown to be important for *Salmonella* persistence during long-term systemic infections, phagosome maturation, and intracellular proliferation (37–39), and SPI-2 genes have been implicated in intestinal colonization, persistence during the intestinal phase, and induction of secretory and inflammatory responses (40–43). Furthermore, recent reports have suggested that expression of the SPI-1 and SPI-2 regulons is not restricted to unique and independent niches. SPI-2–encoded genes can be expressed in the intestinal lumen before penetration of the intestinal epithelium (44), whereas SPI-1 effectors can be detected in infected mice many days after infection (45) or induced intracellularly following phagocytic uptake but not following SPI-1–mediated invasion (19, 46).

Here, we describe a simple method whereby SPI-1 and SPI-2 regulons can be induced sequentially in LB medium, thus providing a unique opportunity to examine the mechanism of switching from SPI-1 to SPI-2 induction. Growth of *Salmonella* in LB has generally been considered to induce expression of the SPI-1 regulon and, conversely, to repress SPI-2 expression (10, 11). Although expression of SPI-2 genes has been previously observed in LB (47, 48), the mechanism involved in their activation has not been investigated. Our data show that SPI-2 genes are activated in LB in a growth phase-dependent manner once the bacteria have reached the late stationary phase and SPI-1 expression has ceased. Under these growth conditions, expression of SPI-2 genes requires the SsrA/B two-component regulatory system, whose essential role in SPI-2 regulon activation has been well documented *in vitro* and *in vivo* (12, 20, 21, 49, 50). In addition, we show that the regulatory pathway activating the SPI-2 regulon in response to stationary growth phase conditions specifically involves the SPI-1–encoded regulator HilD, which also has a hierarchical regulatory function in the activation of the SPI-1 regulon as well as a key role *in vivo* (51). Therefore, HilD appears to be at the center of a regulatory network that connects both SPI-1 and SPI-2 gene expression. The critical question now is how can HilD differentially activate SPI-1 and SPI-2 expression at different growth stages in the same growth medium? In theory the mechanism could depend on a number of different factors: the higher affinity that HilD shows for the *hilA* promoter region versus the *ssrAB* regulatory region; the parallel growth phase-dependent expression of other key SPI-2 regulators such as OmpR; the competitive action of a negative regulatory mechanism turning off SPI-1 expression, thus redirecting HilD toward *ssrAB* activation; and other possibilities that have not yet been investigated.

Analysis of different *Salmonella* genomes has shed light on the evolution of the *Salmonella* genus and suggested that SPI-2 is a more recently acquired virulence trait because it is not present in the phylogenetically older species *S. bongori* (52, 53). In this context, it is tempting to speculate that acquisition of SPI-2 imposed a need to coordinate its expression with preexistent virulence traits so as not to compromise bacterial fitness and efficiency to ensure the successful exploitation of different host niches. In this regard, we have shown that HilD directly binds the regulatory region of *ssrAB* and acts as an H-NS antagonist to allow the OmpR-dependent activation of this operon, which is consistent with its reported function in the activation of *hilA* (29, 30, 54). Adaptation of HilD to antagonize H-NS–dependent repression on the *ssrAB* operon, establishing a transcriptional cross-talk between the previously acquired SPI-1 and the incoming SPI-2, would ensure the coordinated and successive

expression of both regulons under different conditions or host niches, leading to the successful evolution of *Salmonella* as an enteric and facultative intracellular pathogen.

Considering the pleiotropic effects of HilD on the regulation of *Salmonella* virulence factors, dissecting the role of HilD-mediated activation of SPI-2 regulon expression at different stages of an infection or in different hosts will require the precise definition of the *ssrAB* cis-acting elements in which HilD binds to exert its H-NS antagonistic function. The modification of this site at the chromosomal level to prevent HilD binding without affecting H-NS repression or *ssrAB* activation through HilD-independent pathways, such as those acting in N-minimal medium, will provide a strategy to generate *Salmonella* strains in which the HilD-mediated activation of the SPI-1 regulon remains functional. These strains could then be tested in different *in vitro* conditions and infection models to define the role of HilD more clearly in regulating the SPI-2 regulon.

In summary, by revealing the existence of a SPI-1 and SPI-2 transcriptional cross-talk mechanism, this work has disclosed a new level of complexity in the already intricate regulatory networks of *Salmonella* virulence (Fig. S1). HilD seems to coordinate the expression of both regulons in response to changing conditions that may be encountered at different stages during the progression of an infection. Once the bacterium has initiated the program that controls expression of the SPI-1 regulon in the gut lumen, the presence of HilD would help to set the activation of the SPI-2 regulon to perform, for example, its role during the enteric phase of the infection. Inside macrophages, expression of SPI-2 probably relies entirely on the PhoP/SlyA-dependent pathway, consistent with our observations that suggest these two pathways are not likely to overlap *in vivo*, because they are independently active under different growth conditions, and are apparently not synergistic, because each of them is active in the absence of the other. Regulation of the SPI-2 regulon is an example of the complexity of regulatory mechanisms that have evolved by integrating ancestral (e.g., H-NS, OmpR, PhoP), previously acquired (e.g., HilD), and accompanying (e.g., SsrB) regulatory elements into a complex regulatory network, which allows the spatiotemporal and coordinated expression of virulence factors during the infectious process.

Materials and Methods

Strains, Plasmids, and Primers. Bacterial strains, plasmids, and primers used in this study are listed in Tables S1 and S2. Mutant strains were generated by the λ Red recombinase system, as reported previously (55, 56), and as briefly described in *SI Materials and Methods*. Construction of plasmids is also described in detail in *SI Materials and Methods*.

Growth Conditions. LB medium containing 1% tryptone, 0.5% yeast extract, and 1% NaCl at pH 7.5 or N-minimal medium containing 5 mM KCl, 7.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 mM K_2SO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 μM

MgCl_2 , 0.5% glycerol, and 0.1% casamino acids was used for growth of bacterial cultures. Bacterial suspensions were prepared from overnight LB cultures that were concentrated and resuspended in fresh LB or N-minimal medium to an OD_{600} of 1. Then, 250-ml flasks containing 50 ml of LB or N-minimal medium were inoculated with a 50-fold dilution of the bacterial suspensions and incubated at 37°C in a shaken water bath at 200 rpm. (Gyromax 902; Amerex Instruments). Samples used to determine chloramphenicol acetyl transferase (CAT) activity or for Western blot analysis were taken hourly or at specific time points as indicated in the figure legends.

For the H-NS dominant-negative assay, duplicate LB cultures of the strains containing plasmid pMPM-T6 Ω , pT6-HNS-WT, or pT6-HNS-Q92am were initiated as described previously. Two hours later, 0.1% L-(+)-arabinose (Sigma) was added to one duplicate to induce the expression of WT H-NS or the dominant-negative H-NS^{Q92am} protein. Samples for Western blot analysis were taken 8 h after arabinose induction.

Western Blotting. Immunoblots were performed as described in *SI Materials and Methods* using anti-SsrB or anti-OmpR polyclonal antibodies and anti-FLAG M2 (Sigma) or anti-DnaK (StressGen) monoclonal antibodies at 1:10,000, 1:2,000, 1:1,000, and 1:20,000 dilutions, respectively.

Expression and Purification of MBP-HilD and H-NS-His₆. MBP-HilD or H-NS-His₆ fusion protein was expressed in *Escherichia coli* BL21/pLys containing pMAL-HilD1 or pT6-HNS-His₆ and purified from a soluble extract loaded into an amylose column by eluting with column buffer containing 10 mM maltose (Bioxon) or by using a HiTrap Ni²⁺-chelating column, as described in *SI Materials and Methods*. Protein concentration was determined by the Bradford procedure.

EMSA. EMSAs were performed as follows. PCR fragments encompassing the regulatory regions of *ssrAB*, *hilA*, *hilD*, *sopB*, and *sirA* were amplified using primer pairs *ssaBFBgIII/ssrBRS5E*, *hilA1FBamHI/hilA2RHindIII*, *hilDFBamHI/hilDRHindIII*, *sigDH3R/sigDBH1F*, and *sirAFBamHI/sirARHindIII*, respectively (Table S2), and *S. typhimurium* SL1344 chromosomal DNA as a template. Each PCR product (≈ 100 ng) was mixed with increasing concentrations of purified MBP-HilD or H-NS-His₆ in a buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 5% glycerol, and 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ BSA in a final volume of 20 μl . The reactions were incubated for 20 min at room temperature and then electrophoretically separated in 6% polyacrylamide nondenaturing gels in 0.5 \times Tris-borate-EDTA buffer at room temperature. The DNA fragments were stained with ethidium bromide and visualized with an AlphaImager UV transilluminator (Alpha Innotech Corp.).

CAT Assays. The CAT assays and protein quantification to calculate CAT-specific activities were performed as described previously (57).

ACKNOWLEDGMENTS. We thank A. Vázquez and M. Fernández-Mora for excellent technical assistance, L.J. Kenney for anti-SsrB and anti-OmpR antibodies, and S. Miller and F. Heffron for providing *Salmonella* strains. This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (42918Q) (to J.L.P.) and the Howard Hughes Medical Institute (75301–565101) (to J.L.P.) and from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) (IN227306–3) (to V.H.B.). L.C.M. is supported by a predoctoral fellowship from CONACYT (No. 169380). L.A.K. and O.S.M. were supported by the Intramural Research Program of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health.

- Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405:299–304.
- Schmidt H, Hensel M (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 17:14–56.
- Lucchini S, et al. (2006) H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog* 2:e81.
- Navarre WW, et al. (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* 313:236–238.
- Oshima T, Ishikawa S, Kurokawa K, Aiba H, Ogasawara N (2006) *Escherichia coli* histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase. *DNA Res* 13:141–153.
- Navarre WW, McClelland M, Libby SJ, Fang FC (2007) Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes Dev* 21:1456–1471.
- Dorman CJ (2004) H-NS: A universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol* 2:391–400.
- Rimsky S (2004) Structure of the histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome superstructure. *Curr Opin Microbiol* 7:109–114.
- Haraga A, Ohlson MB, Miller SI (2008) Salmonellae interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* 6:53–66.
- Miao EA, Miller SI (2000) A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7539–7544.
- Lundberg U, Vinatzer U, Berdnik D, von Gabain A, Baccharini M (1999) Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol* 181:3433–3437.
- Deiwick J, Nikolaus T, Erdogan S, Hensel M (1999) Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol* 31:1759–1773.
- Altier C (2005) Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* 43(Spec No): 85–92.
- Jones BD (2005) *Salmonella* invasion gene regulation: A story of environmental awareness. *J Microbiol* 43(Spec No):110–117.
- Rhen M, Dorman CJ (2005) Hierarchical gene regulators adapt *Salmonella enterica* to its host milieu. *Int J Med Microbiol* 294:487–502.
- Ellermeier JR, Schlauch JM (2007) Adaptation to the host environment: Regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol* 10:24–29.
- Hensel M (2000) *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* 36:1015–1023.
- Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M, Hinton JC (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 47:103–118.

19. Drecktrah D, Knodler LA, Ireland R, Steele-Mortimer O (2006) The mechanism of *Salmonella* entry determines the vacuolar environment and intracellular gene expression. *Traffic* 7:39–51.
20. Cirillo DM, Valdivia RH, Monack DM, Falkow S (1998) Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* 30:175–188.
21. Walthers D, et al. (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.
22. Knodler LA, et al. (2002) *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. *Mol Microbiol* 43:1089–1103.
23. Ahmer BM (2004) Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 52:933–945.
24. Lee AK, Detweiler CS, Falkow S (2000) OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* 182:771–781.
25. Coombes BK, Brown NF, Valdez Y, Brumell JH, Finlay BB (2004) Expression and secretion of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL. *J Biol Chem* 279:49804–49815.
26. Lober S, Jackel D, Kaiser N, Hensel M (2006) Regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes by independent environmental signals. *Int J Med Microbiol* 296:435–447.
27. Feng X, Oropeza R, Kenney LJ (2003) Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* 48:1131–1143.
28. Bijlsma JJ, Groisman EA (2005) The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 57:85–96.
29. Olekhnovich IN, Kadner RJ (2006) Crucial roles of both flanking sequences in silencing of the *hilA* promoter in *Salmonella enterica*. *J Mol Biol* 357:373–386.
30. Schechter LM, Lee CA (2001) AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella typhimurium* *hilA* promoter. *Mol Microbiol* 40:1289–1299.
31. Duong N, et al. BK (2007) Thermosensing coordinates a *Cis*-regulatory module for transcriptional activation of the intracellular virulence system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Biol Chem* 282:34077–34084.
32. Ueguchi C, Seto C, Suzuki T, Mizuno T (1997) Clarification of the dimerization domain and its functional significance for the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J Mol Biol* 274:145–151.
33. Ueguchi C, Suzuki T, Yoshida T, Tanaka K, Mizuno T (1996) Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J Mol Biol* 263:149–162.
34. Olekhnovich IN, Kadner RJ (2002) DNA-binding activities of the HilC and HilD virulence regulatory proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 184:4148–4160.
35. Olekhnovich IN, Kadner RJ (2007) Role of nucleoid-associated proteins Hha and H-NS in expression of *Salmonella enterica* activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion. *J Bacteriol* 189:6882–6890.
36. Dorman CJ (2007) H-NS, the genome sentinel. *Nat Rev Microbiol* 5:157–161.
37. Brawn LC, Hayward RD, Koronakis V (2007) *Salmonella* SPI1 effector SipA persists after entry and cooperates with a SPI2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication. *Cell Host Microbe* 1:63–75.
38. Steele-Mortimer O, et al. (2002) The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. *Cell Microbiol* 4:43–54.
39. Lawley TD, et al. (2006) Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* 2:e11.
40. Hapfelmeier S, et al. (2005) The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar Typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* 174:1675–1685.
41. Coombes BK, et al. (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.
42. Coburn B, Li Y, Owen D, Vallance BA, Finlay BB (2005) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* 73:3219–3227.
43. Bispham J, Tripathi BN, Watson PR, Wallis TS (2001) *Salmonella* pathogenicity island 2 influences both systemic salmonellosis and *Salmonella*-induced enteritis in calves. *Infect Immun* 69:367–377.
44. Brown NF, et al. (2005) *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS Pathog* 1:e32.
45. Giacomodonato MN, et al. (2007) SipA, SopA, SopB, SopD and SopE2 effector proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are synthesized at late stages of infection in mice. *Microbiology* 153:1221–1228.
46. Drecktrah D, Knodler LA, Galbraith K, Steele-Mortimer O (2005) The *Salmonella* SPI1 effector SopB stimulates nitric oxide production long after invasion. *Cell Microbiol* 7:105–113.
47. Silphaduang U, Mascarenhas M, Karmali M, Coombes BK (2007) Repression of intracellular virulence factors in *Salmonella* by the Hha and YdgT nucleoid-associated proteins. *J Bacteriol* 189:3669–3673.
48. Lim S, Kim B, Choi HS, Lee Y, Ryu S (2006) Fis is required for proper regulation of *ssaG* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog* 41:33–42.
49. Hensel M, et al. (1998) Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* 30:163–174.
50. Worley MJ, Ching KH, Heffron F (2000) *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Mol Microbiol* 36:749–761.
51. Ellermeier CD, Ellermeier JR, Schlauch JM (2005) HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 57:691–705.
52. Hensel M, et al. (1997) Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 179:1105–1111.
53. Baumlér AJ (1997) The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends Microbiol* 5:318–322.
54. Schechter LM, Damrauer SM, Lee CA (1999) Two AraC/XylS family members can independently counteract the effect of repressing sequences upstream of the *hilA* promoter. *Mol Microbiol* 32:629–642.
55. Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6640–6645.
56. Uzzau S, Figueroa-Bossi N, Rubino S, Bossi L (2001) Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:15264–15269.
57. Martínez-Laguna Y, Calva E, Puente JL (1999) Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 33:153–166.

PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*

Víctor H. Bustamante, Miryam I. Villalba, Víctor A. García-Angulo, Alejandra Vázquez, Luary C. Martínez, Rafael Jiménez and José L. Puente*

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México.

Summary

Ler, encoded by the locus of enterocyte effacement (LEE) of attaching and effacing (A/E) pathogens, induces the expression of LEE genes by counteracting the silencing exerted by H-NS. Ler expression is modulated by several global regulators, and is activated by GrlA, which is also LEE-encoded. Typical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains contain the EAF plasmid, which carries the *perABC* locus encoding PerC. The precise role of PerC in EPEC virulence gene regulation has remained unclear, mainly because EPEC strains lacking the pEAF still express the LEE genes and because PerC is not present in other A/E pathogens such as *Citrobacter rodentium*. Here, we describe that either PerC or GrlA can independently activate *ler* expression and, in consequence, of LEE genes depending on the growth conditions. Both PerC and GrlA, with the aid of IHF, counteract the repression exerted by H-NS on *ler* and can also further increase its activity. Our results substantiate the role of PerC and GrlA in EPEC virulence gene regulation and suggest that these convergent regulatory mechanisms may have represented an evolutionary adaptation in EPEC to co-ordinate the expression of plasmid- and chromosome-encoded virulence factors needed to successfully colonize its intestinal niche.

Introduction

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a major cause of childhood diarrhoea in developing countries (Chen and Frankel, 2005). The main virulence trait of

EPEC is its capacity to produce the attaching and effacing (A/E) lesion on intestinal enterocytes, generating gastrointestinal disorders in infected hosts (Chen and Frankel, 2005; Hayward *et al.*, 2006). Another important human pathogen, enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), as well as the rabbit-specific EPEC (REPEC) and the mice pathogen *Citrobacter rodentium*, are bacteria that also produce the A/E lesion in their respective hosts (Marches *et al.*, 2000; Mundy *et al.*, 2005; Hayward *et al.*, 2006; Croxen and Finlay, 2010). These bacteria conform the A/E family of intestinal pathogens.

Initially, EPEC interacts with the intestinal epithelial cells in a non-intimate manner, forming clearly defined groups of bacteria on the cell surface in a characteristic pattern termed localized adherence (LA) (Nougayrede *et al.*, 2003; Humphries and Armstrong, 2010). Then, a bacterial effector protein called Tir (Translocated intimin receptor) is translocated and inserted into the host cell membrane, from where it interacts with intimin, a bacterial outer membrane adhesin. Upon this interaction, EPEC induces the localized loss of enterocyte microvilli and important cytoskeleton rearrangements beneath the adherent bacteria, leading to the formation of actin-rich cup-like structures (Hayward *et al.*, 2006; Spears *et al.*, 2006; Campellone, 2010).

The LA phenotype is mediated by the bundle-forming pilus (BFP), a type IV pilus produced by classical EPEC strains carrying the EAF plasmid, which contains the *bfp* operon and the *perABC* (plasmid encoded regulator) gene cluster. The genes responsible for A/E lesion formation are located within a pathogenicity island known as the locus of enterocyte effacement (LEE) (Clarke *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2004; Kaper *et al.*, 2004; Garmendia *et al.*, 2005). The LEE contains five polycistronic (*LEE1* to *LEE5*) and two bicistronic (*rorf1-espG* and *grlRA*) operons, as well as four individual genes (*rorf3*, *cesF*, *map* and *escD*). The *LEE1* to *LEE3* operons encode most of the proteins (Esc and Sep) required for the biogenesis of a type III secretion system (T3SS), which translocates bacterial effector proteins into the host epithelial cells, then interfering with different eukaryotic cell processes and signalling pathways leading to disease. The *LEE4* operon encodes proteins involved in protein translocation (EspA, B and D) and the *LEE5* operon those required for intimate attachment (intimin and Tir). Other genes

Accepted 22 August, 2011. *For correspondence. E-mail puente@ibt.unam.mx; Tel. (+52) (777) 329 1621; Fax (+52) (777) 313 8673.