



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto global de los sistemas de regulación BarA/SirA y Csr en la expresión de proteínas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Maestra en Ciencias

PRESENTA

Jessica Nava Galeana

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Cinthia Ernestina Núñez López
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. José Adelfo Escalante Lozada
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Mayo, 2018



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

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dra. Cinthia Ernestina Nuñez López

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Presidente Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Secretario Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Vocal Dr. Dimitris Georgellis

Vocal Dra. Clarita Olvera Carranza

Vocal Dra. Georgina Gurrola Briones

Durante el desarrollo de mi proyecto de maestría, recibí una beca del CONACyT (no. 429934), así como apoyo de los proyectos PAPIIT-UNAM (IN203415 y IN202418) y CONACyT-CB (254531).

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Alicia y Alejandro, que desde siempre me apoyaron en mis ganas de superarme profesionalmente. Porque en los días difíciles siempre estuvieron conmigo y siempre me ofrecieron sus sabios consejos de su propia experiencia de vida. Aprecio la confianza que depositaron en mí sobre todo después de vivir tiempo alejada de ellos. Por esas llamadas en las noches y los días de trabajo, que, aunque sé que ambos estaban cansados, siempre me ayudaban a relajarme a través de risas. Gracias por todo su amor y cariño.

A mis hermanos, Alicia e Irving, qué, de igual manera, siempre estaban al pendiente de mí y me apoyaban desde lejos. Gracias pavis por ese cariño que me dieron cuando los veía en vacaciones. Gracias hermana por esos mensajes diarios y gracias hermano por esas pláticas constructivas que tuvimos.

A mis amigos, Merle, Eunice, Mónica, Mirza, Jessica, Frank y a todas mis demás amistades en Cancún que me dieron palabras de aliento cuando más lo necesité, quienes me inspiraban con grandes lecciones de vida.

Agradezco también a la Dra. Tania, que más que ser mi maestra, considero una gran amiga, por todas las palabras de aliento y de ánimo y por todo el aprendizaje que me brindó en el laboratorio del ICMYL. Gracias por inspirarme con tus palabras, inclusive después de tiempo lo sigues haciendo.

A mis amigos del posgrado, Dubhe, Mariana, Priscila, Karen y a todos los demás de la generación 2016-2. A mis amigos fuera del posgrado y del instituto, a David, a mi profesor Luis Ariza y en especial a mi coach Andrea. Con ellos aprendí a sobrellevar los problemas que se dieron durante estos dos años.

A mis amigos de laboratorio, Magdalena, Claudia y Diego, por brindarme su amistad y estar siempre apoyándome cuando más lo he necesitado. También a Paloma, Liliana, Marcos, Álvaro y a la Dra. Deyanira, quienes también me han ofrecido su amistad conjuntamente con su ayuda en el laboratorio y con otras cuestiones personales y profesionales. A doña Rebe y a Mario, por su ayuda durante el desarrollo de mi proyecto. También agradezco a mis demás compañeros y amigos del grupo Calva/Puente, por su amabilidad y ser accesibles a cualquier duda. A todos ellos, por compartir grandes momentos a lo largo de estos dos años.

Agradezco al Dr. Víctor H. Bustamante Santillán por permitirme realizar mi proyecto de maestría en su laboratorio. Gracias por esas revisiones a mi trabajo que sin duda me han ayudado mucho en mi crecimiento profesional. Gracias por su accesibilidad a cualquier duda o comentario de mi trabajo y por ser mi guía durante estos dos años.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Cinthia E. Núñez López y al Dr. J. Adelfo Escalante Lozada, por sus comentarios constructivos en cada tutorial para la mejora de mi proyecto y para el desarrollo de mi habilidad crítica.

A los miembros del jurado de tesis, la Dra. Elda Guadalupe Espin Ocampo, al Dr. Alfredo Martínez Jiménez, al Dr. Dimitris Georgellis, la Dra. Clarita Olvera Carranza y la Dra. Georgina Gurrola Briones por sus comentarios a mi trabajo.

A la Unidad de Docencia, conformada por Jalil Saab, Antonio Bolanos y Gloria Villa por su apoyo y agilización de trámites.

A la Unidad de Computo del IBT, conformada por Arturo Ocádiz Ramírez, Juan Manuel Hurtado Ramírez, Roberto Pablo Rodríguez Bahena, David Santiago Castañeda Carreón y Servando Aguirre Cruz, por su efectiva solución a los problemas técnicos.

A la Unidad de Biblioteca del IBT, conformada por Shirley Elizabeth Ainsworth y Jesús Omar Arriaga por su apoyo con la obtención de bibliografía y referencias, así como su apoyo en las videoconferencias durante los seminarios.

Agradezco al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM, por permitirme realizar mis estudios de posgrado y al Instituto de Biotecnología de la UNAM, por permitirme hacer uso de sus instalaciones.

Agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), por los fondos otorgados para asistencia a Congreso Nacional.

A CONACyT por mi beca número 429934, así como a los fondos de los proyectos de PAPIIT (IN203415 y IN202418) y CONACyT C-B (254531), que me permitieron realizar mis estudios de posgrado.

RESUMEN

Los sistemas de regulación BarA/SirA y Csr regulan diferentes funciones celulares en un gran número de bacterias, como metabolismo del carbono, quorum sensing, estrés oxidativo, movilidad, biopelículas y virulencia. Ambos sistemas de regulación se conectan a través de un interesante mecanismo. BarA es una cinasa transmembranal que se autofosforila cuando detecta ácidos grasos de cadena corta, como el acetato, y es capaz de fosforilar a su regulador de respuesta SirA. Entonces, SirA actúa como un regulador transcripcional al unirse sobre la región reguladora de los genes *csrB* y *csrC*, activando así su expresión. CsrB y CsrC son RNA pequeños (sRNAs) que se unen a la proteína de unión a RNA CsrA. A su vez, CsrA se une sobre motivos GGA que generalmente se encuentran sobre el sitio de unión a ribosomas (SD) o sobre el codón de inicio de algunos de sus RNA mensajeros (RNAm) blanco, reprimiendo así su traducción. Adicionalmente, CsrA activa la expresión de algunos de sus genes blanco, evitando la formación de estructuras que secuestran al SD o que favorecen la degradación de los RNAm. CsrB y CsrC contienen múltiples motivos GGA que mimetizan los sitios de unión de CsrA; así, CsrB y CsrC atrapan a CsrA e impiden su función.

Estudios previos indican que los sistemas BarA/SirA y CsrB/C regulan positivamente la expresión de los genes de la isla de patogenicidad 1 (SPI-1, por “*Salmonella* Pathogenicity Island”), los cuales se requieren para la invasión de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) a células hospederas. Asimismo, se ha reportado que los sistemas BarA/SirA y Csr controlan la expresión de otros genes en *S. Typhimurium*. En este trabajo nos planteamos determinar el efecto global de los sistemas BarA/SirA y Csr en *S. Typhimurium*, en condiciones de crecimiento que favorecen la expresión de los genes de SPI-1 y varios otros genes de virulencia de esta bacteria. Para esto, realizamos un análisis proteómico mediante LC-MS/MS, en la cepa silvestre (WT) de *S. Typhimurium*, y en sus derivadas cepas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$ crecidas hasta una OD_{600nm} de 1.4 en medio LB a 37°C. En nuestro estudio se identificó un total de 1,268 proteínas entre las tres cepas analizadas. La expresión de 164 de estas proteínas se afectó en una o en ambas cepas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, con respecto a la cepa WT, lo cual reveló el regulón de los sistemas BarA/SirA y Csr en *S. Typhimurium*, en las condiciones de crecimiento probadas. Empleando una búsqueda de su función biológica en bases de datos como el KEEG, Uniprot, NCBI y STRING, se clasificaron en funciones como virulencia, movilidad, metabolismo y otras funciones diversas; algunas no se les logró asignar una probable función. Para 33 de estas 164 proteínas no hay reportes previos que indiquen que su expresión se controla

por BarA/SirA y Csr ni en *Salmonella* ni en *E. coli*, así que representan nuevos blancos de estos sistemas.

Interesantemente, encontramos que los sistemas BarA/SirA y CsrB/C reprimen la expresión de los operones *pdu* y *cbi*, los cuales están involucrados en la replicación de *Salmonella* en el lumen intestinal, mientras que activan la expresión de los genes de SPI-1, que se necesitan para la invasión de *Salmonella* al epitelio intestinal. Esto sugiere que los sistemas BarA/SirA y Csr podrían controlar la transición entre los estilos de vida extracelular (en el lumen del intestino) e intracelular (dentro de las células del epitelio intestinal) de *Salmonella*. Adicionalmente, encontramos que la expresión de 25 proteínas fue diferente entre las mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, lo que sugiere que los sistemas BarA/SirA y Csr podrían tener un efecto independiente, uno del otro, para algunos genes. Como un ejemplo, encontramos que la expresión de YqcC es regulada negativamente por CsrB/C, pero no por SirA.

Mediante fusiones traduccionales y Western blot, confirmamos la regulación de los sistemas BarA/SirA y Csr sobre la expresión de YebF, una de las proteínas identificadas en nuestro análisis proteómico; la expresión de *yebF* es regulada positivamente por los sistemas BarA/SirA y los sRNAs CsrB/C y negativamente por CsrA. Asimismo, mostramos que YebF no tiene ningún efecto en la movilidad, invasión o replicación intracelular de *Salmonella* en células HeLa. Finalmente, confirmamos que los sistemas BarA/SirA y CsrB/C regulan positivamente la expresión de HilE, el cual es un regulador negativo de los genes de SPI-1.

Nuestros resultados permitieron identificar nuevos genes pertenecientes al regulón de los sistemas BarA/SirA y Csr en *S. Typhimurium*; asimismo, proveen información importante acerca de nuevas funciones celulares y mecanismos moleculares controlados por estos sistemas en *Salmonella*.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
RESUMEN.....	4
ÍNDICE	6
Índice de figuras.....	8
Índice de tablas.....	8
INTRODUCCIÓN.....	10
El género de <i>Salmonella</i> y su importancia biológica.....	10
Mecanismo de patogénesis.....	10
Factores de virulencia de <i>Salmonella</i>	11
Flagelo.....	11
Fimbria	11
Plásmido.....	12
Sistema de secreción tipo III (SST3).....	12
Islas de patogenicidad (SPIs) 1 y 2.....	12
Regulación de la expresión genética.....	14
Generalidades de los sistemas BarA/SirA y Csr	16
Regulación de los sistemas BarA/SirA y Csr.....	19
ANTECEDENTES.....	22
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
Objetivo general	24
Objetivos específicos	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Preparación de muestras para el análisis por LC-MS/MS.....	27
Análisis proteómico	28
Cinética de crecimiento	28
Extracción de DNA genómico y plasmídico	29
Electroforesis de DNA en geles de agarosa	30
Amplificación por PCR	30
Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida	30
Perfil de secreción de SPI-1	31

Preparación de células competentes para electroporación.....	31
Construcción de mutantes o etiquetadas mediante mutagénesis	32
Remoción del casete de resistencia a Kanamicina (Km)	33
Transducción con el fago P22	34
Ensayos de Western blot.....	35
Construcción de fusiones traduccionales al gen reportero <i>lacZ</i>	36
Cuantificación de proteínas para la determinación de la actividad específica de β -galactosidasa	37
Medición de la actividad β -galactosidasa	37
Ensayo de movilidad en agar	38
Ensayos de invasión y replicación.....	38
Análisis estadístico.....	39
RESULTADOS	40
Caracterización de las cepas $\Delta sirA::Km$, $\Delta csrB::Km$, $\Delta csrC::Km$ y $\Delta csrB \Delta csrC::Km$..	40
Análisis proteómico	41
Caracterización de las cepas $\Delta sirA$, $\Delta csrB$, $\Delta csrC$ y $\Delta csrB \Delta csrC$	46
Confirmación de la regulación por SirA y/o Csr de los genes <i>ydcJ</i> , <i>yebF</i> y <i>yqcC</i> mediante fusiones traduccionales a <i>lacZ</i>	47
Confirmación de la regulación por SirA y Csr del gen <i>yebF</i> mediante ensayos de Western blot.....	53
La proteína YebF se secreta en <i>S. Typhimurium</i>	54
YebF no está involucrado en la movilidad de <i>S. Typhimurium</i>	55
YebF no está involucrado en la invasión o replicación intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en células HeLa	55
La expresión de H1E es regulada por SirA y Csr.....	57
DISCUSIÓN.....	59
CONCLUSIONES	68
PERSPECTIVAS	69
ANEXO 1. Datos obtenidos en este estudio.....	70
ANEXO 2: Gráficas de las proteínas expresadas diferencialmente en las cepas $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$	78
ANEXO 3: Mapa de calor de las proteínas obtenidas en este estudio	80
ANEXO 4: Medios y soluciones	81
REFERENCIAS	84

Índice de figuras

Fig. 1. Mecanismo de infección de <i>Salmonella</i>	11
Fig. 2. Cascada de regulación sobre los genes de SPI-1 y SPI-2 en <i>S. Typhimurium</i>	14
Fig. 3. Modelo de regulación de la expresión de genes por los sistemas BarA/SirA y Csr..	15
Fig. 4. Esquema general de mutagénesis	33
Fig. 5. Fusiones traduccionales al gen reportero <i>lacZ</i>	37
Fig. 6. Caracterización de las cepas de <i>S. Typhimurium</i> WT, $\Delta sirA::Km$, $\Delta csrB::Km$, $\Delta csrC::Km$ y $\Delta csrB \Delta csrC::Km$	41
Fig. 7. Clasificación de las proteínas identificadas en el análisis proteómico	42
Fig. 8. Clasificación de las proteínas expresadas diferencialmente en las distintas cepas de <i>S. Typhimurium</i>	46
Fig. 9. Caracterización de las cepas de <i>S. Typhimurium</i> WT $\Delta sirA$, $\Delta csrB$, $\Delta csrC$ y $\Delta csrB$ $\Delta csrC$	47
Fig. 10. Cuantificación relativa de la expresión de YdcJ, YebF, SL2374, SLP2_0011, CbiP y YqcC	48
Fig. 11. Contexto genómico de <i>ydcJ</i> , <i>yebF</i> , <i>SLP2_0011</i> , <i>SL2374</i> , <i>cbiP</i> y <i>yqcC</i>	50
Fig. 12. La expresión de YdcJ, YebF y YqcC, pero no de SL2374, SLP2_0011 y CbiP, es regulada por SirA y/o CsrB/C.....	52
Fig. 13. La expresión de YdcJ, YebF y YqcC es regulada por CsrA.....	53
Fig. 14. Los sistemas BarA/SirA y Csr regulan la expresión de YebF	54
Fig. 15. La proteína YebF se secreta en <i>S. Typhimurium</i>	55
Fig. 16. La ausencia de <i>yebF</i> no afecta la movilidad de <i>S. Typhimurium</i>	55
Fig. 17. YebF no está involucrada en los fenotipos de invasión o replicación intracelular de <i>S. Typhimurium</i> en células HeLa	57
Fig. 18. Los sistemas BarA/SirA y Csr regulan la expresión de HilE	58
Fig. 19. Los sistemas de regulación BarA/SirA y Csr están involucrados en la generación de dos poblaciones de <i>S. Typhimurium</i> en el lumen	62
Fig. 20. Los sistemas BarA/SirA y los sRNAs CsrB/C regulan negativamente a los genes de SPI-1, inhibiendo el efecto adverso en el crecimiento por la sobre-expresión de estos genes.....	67

Índice de tablas

Tabla 1. Ortólogos de los sistemas BarA/SirA y Csr en diversas proteobacterias	16
Tabla 2. Cepas bacterianas usadas en este estudio	25
Tabla 3. Plásmidos usados en este estudio	25
Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este estudio	26

Tabla 5. Antibióticos y dosis empleadas en este estudio	27
Tabla 6. Componentes de la mezcla de reacción de PCR	30
Tabla 7. Reactivos para preparar geles de acrilamida	31
Tabla 8. Transducción con el fago P22.....	35

INTRODUCCIÓN

El género de *Salmonella* y su importancia biológica

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y agrupa a bacterias Gram-negativas que se dividen en dos especies: *S. bongori* y *S. enterica*. Esta última se divide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (Brenner *et al.*, 2000; Sabbagh *et al.*, 2010). *S. enterica* infecta a animales de sangre caliente, mientras que *S. bongori* principalmente infecta a animales de sangre fría como los reptiles, aunque se han llegado a detectar algunas infecciones en humanos (Brenner *et al.*, 2000; Giammanco *et al.*, 2002; Fookes *et al.*, 2011).

La subespecie *enterica* se subdivide en más de 2500 serotipos o serovares, de acuerdo a los antígenos de superficie O (lipopolisacárido) y el H (flagelo) (Sabbagh *et al.*, 2010). El serovar Typhi está restringido a infectar humanos, produciendo infecciones sistémicas. Por su parte, el serovar Typhimurium produce enfermedades gastrointestinales en humanos y en varios animales. Además, puede causar una infección sistémica en pollos pequeños y humanos inmunocomprometidos, así como en ratones BALB/c, los cuales contienen una mutación en la proteína transportadora de membrana específica de macrófagos, Nramp1 (Slc11A1) (Vidal *et al.*, 1995). Las infecciones gastrointestinales afectan principalmente a niños y adultos mayores o personas inmunodeprimidas, especialmente en países en subdesarrollo. La creciente detección de cepas de *Salmonella* con múltiples resistencias a antibióticos (como las fluoroquinolonas y cefalosporinas) son un obstáculo en el tratamiento de estas enfermedades y siguen causando miles de muertes en el mundo (Crump *et al.*, 2004; Majowicz *et al.* 2010; Khan *et al.*, 2016). Además, *S. enterica* afecta también a animales de importancia de la industria avícola y ganadera (Forshell & Wierup, 2006). Debido a que *S. enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium (a partir de ahora *S. Typhimurium*) causa tanto una infección intestinal como sistémica de acuerdo a su hospedero, se ha utilizado como modelo para estudiar los mecanismos de virulencia de *S. enterica*.

Mecanismo de patogénesis

El mecanismo de entrada de *Salmonella* al hospedero es mediante la ingesta de alimentos o agua contaminados (Figura 1) (Haraga *et al.*, 2008; Fàbrega & Vila, 2013). Una vez que llega al intestino delgado, tiene que atravesar la mucosa intestinal para ganar acceso a las células epiteliales y adherirse a ellas. Una vez allí, la bacteria inicia el remodelamiento del citoesqueleto de los enterocitos, generando ondulaciones en la membrana de estas células, que permiten la introducción de *Salmonella* por endocitosis en vesículas grandes denominadas vacuolas

contenedoras de *Salmonella*, necesarias para que esta bacteria sobreviva y se replique. Después, estas vacuolas migran por la red de microtúbulos a una posición perinuclear, muy cerca del aparato de Golgi, lo cual facilita la intercepción de vesículas para obtener nutrientes que permitan que la bacteria se replique. Sin embargo, una parte de estas vacuolas puede dirigirse a la membrana basolateral de las células intestinales, donde las bacterias son fagocitadas por macrófagos. Además, las bacterias pueden ser directamente endocitadas por las células microplegadas (células M) o fagocitadas por células dendríticas localizadas en el lumen intestinal. Este paso es necesario para que *Salmonella* se propague a otros órganos como hígado y bazo, produciendo una infección sistémica.

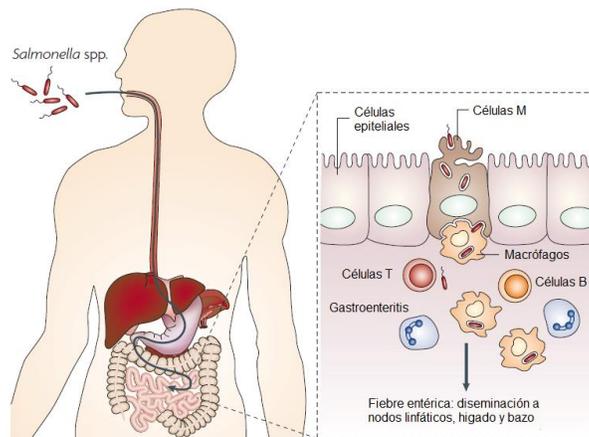


Fig. 1. Mecanismo de infección de *Salmonella*. (Tomado y modificado de Haraga *et al.*, 2008).

Factores de virulencia de *Salmonella*

Flagelo

La producción del flagelo y, por ende, de la movilidad, les permite a las bacterias explorar nuevos microambientes y escapar de aquellos que son perjudiciales; además, la movilidad es importante en diversas bacterias patógenas (Chilcott & Hughes, 2000). La producción de flagelos en *Salmonella* permite la aproximación de la bacteria al epitelio intestinal y así adherirse e invadir estas células; por tanto, una cepa mutante en el sistema flagelar presenta defectos en la invasión (Stecher *et al.*, 2004).

Fimbria

Las fimbrias son apéndices proteicos de superficie que tienen capacidad de unirse a glicoproteínas. En *S. Typhimurium* están involucradas en la patogenicidad al facilitar la unión de la bacteria a las células intestinales del hospedero (Kukkonen *et al.*, 1993).

Plásmido

El plásmido de virulencia pSLT de *Salmonella* contiene el operón *spvRABCD*, el cual codifica para proteínas involucradas en las etapas tempranas de la invasión; además, codifica la fimbria Pef necesaria para la adhesión de la bacteria a las células del hospedero (Rotger & Casadesús, 1999).

Sistema de secreción tipo III (SST3)

Salmonella expresa dos distintos sistemas de secreción tipo III (SST3), los cuales son esenciales para su virulencia (Fàbrega & Vila, 2013). Los SST3 son complejos macromoleculares compuestos por más de 20 proteínas, que consisten de una base embebida en la membrana de la bacteria y una aguja delgada que sobresale del espacio extracelular (Burkinshaw & Strynadka, 2014). Estos translocan una serie de proteínas efectoras desde la bacteria hacia las células hospederas, las cuales modifican las vías de transducción de señales del hospedero que le permiten a *Salmonella* invadir y replicarse dentro de estas células. Este complejo está ampliamente conservado en distintas bacterias y está relacionado al sistema flagelar (Chilcott & Hughes, 2000).

Islas de patogenicidad (SPIs) 1 y 2

La adquisición de genes por transferencia horizontal ha sido trascendental en la evolución de la patogenicidad de *S. enterica*; las funciones de los genes adquiridos le han permitido adaptarse a las distintas condiciones ambientales de su ciclo de vida, incluyendo las condiciones que encuentra en diferentes nichos durante la infección a sus hospederos (Haraga *et al.*, 2008). La mayoría de genes de virulencia de *S. enterica* están agrupados en el genoma en regiones denominadas islas de patogenicidad (SPI, por “*Salmonella* Pathogenicity Islands”) (Fàbrega & Vila, 2013).

La isla 1 (SPI-1) contiene 39 genes que codifican para un SST3 (SST3-1), varias proteínas efectoras y sus chaperonas, así como para reguladores transcripcionales. Una vez que *Salmonella* se encuentra en el intestino de sus hospederos, el regulador HilD, codificado en SPI-1, induce la expresión de los genes de esta isla, así como la de otros genes de virulencia localizados fuera de ella. Las proteínas efectoras son inyectadas de la bacteria a las células epiteliales del intestino, a través del SST3-1, las cuales modifican varias rutas de transducción de señales y causan rearrreglos del citoesqueleto en las células eucariotas, favoreciendo la invasión de *Salmonella* a sus células hospedadoras y la producción de diarrea (Que *et al.*, 2013).

Salmonella induce la inflamación en los enterocitos a partir de las proteínas efectoras inyectadas a estas células a través del SST3-1; esta estrategia le permite

a la bacteria desplazar a la microbiota intestinal (Stecher *et al.*, 2007; Ilyas *et al.*, 2017). A su vez, el proceso inflamatorio activa la respuesta inmune y el flujo de neutrófilos que liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) en el lumen. Las ROS reaccionan con tiosulfato (compuesto generado a partir de la oxidación del H₂S por la mucosa intestinal), generando tetrionato (Winter 2010). Además, en el intestino se encuentra el propanediol, un subproducto generado a partir del metabolismo de ramnosa y fucosa (Price-Carter *et al.*, 2001). *Salmonella* es capaz de utilizar el propanediol como fuente de carbono, debido a que contiene los genes *pdu* que codifican para las enzimas requeridas para el metabolismo de este compuesto, y utiliza como cofactor a la vitamina B₁₂, la cual es sintetizada por *Salmonella* a través de las proteínas codificadas por el operón *cbi*. El metabolismo del propanediol requiere la utilización del tetrionato como aceptor de electrones, el cual es reducido a partir de las proteínas codificadas en los genes *ttr*, encontrados en SPI-2 (Price-Carter *et al.*, 2001; Winter 2010). De esta manera, *Salmonella* sobrevive y se replica en el ambiente anaeróbico del intestino (Ilyas *et al.*, 2017).

La isla 2 (SPI-2) contiene 44 genes que codifican para otro SST3 (SST3-2), para diferentes proteínas efectoras y sus chaperonas, así como para reguladores transcripcionales. Cuando *Samonella* se encuentra dentro de sus células hospederas, en vacuolas, el sistema de regulación SsrA/B codificado en SPI-2, induce la expresión de los genes de esta isla, así como la de otros genes de virulencia localizados fuera de ella. Las proteínas efectoras de SPI-2 son translocadas de la bacteria al citoplasma de las células eucariotas, a través del SST3-2, las cuales permiten la replicación y sobrevivencia de *Salmonella* en sus células hospederas; su replicación y sobrevivencia en macrófagos lleva a la diseminación de la bacteria hacia diferentes órganos de sus hospederos, produciendo una enfermedad sistémica (Fass & Groisman, 2009).

En condiciones de laboratorio, la expresión de los genes de SPI-1 se inducen en la fase estacionaria temprana de crecimiento cuando se crece a *Salmonella* en el medio rico en nutrientes "Lysogeny Broth" (LB); mientras que los genes de SPI-2 se inducen en una fase estacionaria tardía de crecimiento en medio LB, así como creciendo a *Salmonella* en medios mínimos, tal como el medio mínimo-N (MM-N) (Bustamante *et al.*, 2008). Con base en esto, se piensa que la fase estacionaria temprana de crecimiento en LB asemeja de algún modo el ambiente intestinal, ya que favorece la expresión de los genes de SPI-1, y que la fase estacionaria tardía de crecimiento en LB y el crecimiento en MM-N asemejan de alguna manera el ambiente intracelular que encuentra *Salmonella* en sus células hospedadoras, ya que favorece la expresión de los genes de SPI-2.

Regulación de la expresión genética

La regulación genética es esencial para que las bacterias puedan sobrevivir y replicarse en el ambiente y, en el caso de las bacterias patógenas, en distintos nichos de sus hospederos. Diferentes reguladores específicos de la bacteria controlan la expresión de los genes de virulencia de *Salmonella*, incluyendo a los genes de SPI-1 y SPI-2, requeridos para la invasión y replicación intracelular, respectivamente, así como de varios otros genes localizados en diferentes regiones del genoma (Figura 2). El regulador transcripcional HilD, codificado en SPI-1, controla positivamente la expresión de los reguladores transcripcionales HilA e InvF, también codificados en SPI-1, los cuales, a su vez, activan la expresión de los demás genes de SPI-1 (Fàbrega & Vila, 2013). Otros reguladores codificados fuera de SPI-1 también están involucrados en la expresión de los genes de esta isla; por ejemplo, la proteína HilE reprime la expresión de los genes de SPI-1 al unirse e inactivar a HilD (Baxter *et al.*, 2003). Por otra parte, el sistema de dos componentes SsrA/B, codificado en SPI-2, controla positivamente la expresión de los genes de SPI-2 (Fàbrega & Vila, 2013). Recientemente se demostró que cuando *Salmonella* se encuentra en un ambiente intracelular, el sistema SsrA/B reprime la expresión de los genes de SPI-1, actuando directamente sobre los genes *hilD* y *hilA* (Pérez-Morales *et al.*, 2017).

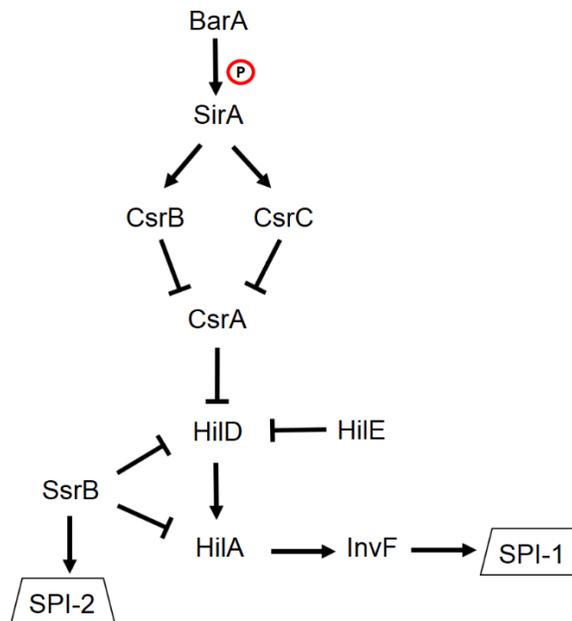


Fig. 2. Cascada de regulación sobre los genes de SPI-1 y SPI-2 en *S. Typhimurium*. Ver el apartado “Regulación de la expresión genética” para mayor detalle.

Varios reguladores globales también controlan la expresión de SPI-1, entre estos, el sistema de dos componentes BarA/SirA y el sistema Csr, los cuales regulan la expresión de HiiD (Martínez *et al.*, 2011) (Figura 2). BarA es una proteína cinasa transmembranal que se autofosforila cuando detecta una señal, y, entonces, es capaz de fosforilar a su regulador de respuesta SirA. En su forma fosforilada, SirA induce directamente la expresión de los sRNAs CsrB y CsrC, los cuales tienen 18 y 9 sitios de unión para la proteína CsrA, respectivamente (Seyll & Van Melderen, 2013). CsrA es una proteína que regula negativamente la traducción y estabilidad de RNAm, debido a que generalmente se une a sitios que se superponen al sitio de unión a ribosomas (secuencia SD, “Shine-Dalgarno”) y al codón de inicio de sus genes blanco. Además, CsrA también regula positivamente la expresión de algunos genes, al prevenir la formación de estructuras de RNA que atrapan la secuencia SD o que favorecen la degradación de los RNAm (Vakulskas *et al.*, 2015). Cuando CsrB y CsrC se expresan, se unen y capturan a CsrA, y de esta manera antagonizan el efecto postranscripcional que CsrA ejerce sobre sus genes blanco (Seyll & Van Melderen, 2013) (Figura 3).

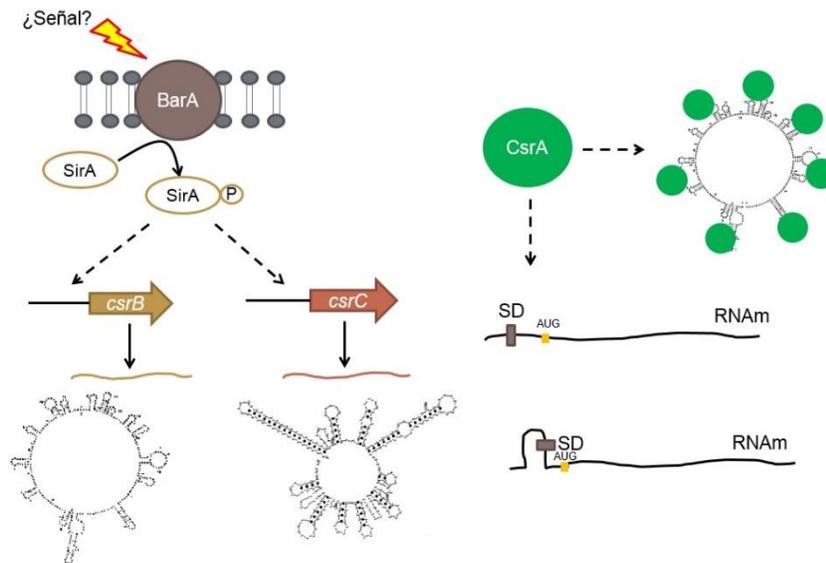


Fig. 3. Modelo de regulación de la expresión de genes por los sistemas BarA/SirA y Csr. La autofosforilación de BarA a partir de una señal del medio extracelular permite que se transfiera el grupo fosforilo hacia el regulador de respuesta SirA. Entonces, SirA-P se une a la región reguladora de *csrB* y *csrC*, lo que permite su transcripción. Los sRNAs CsrB y CsrC contienen estructuras tipo tallo-asa que permiten la unión de dímeros de CsrA. La proteína de unión a RNA, CsrA, es un regulador postranscripcional que reprime la expresión de algunos de sus genes blanco al unirse sobre la secuencia SD o sobre el codón de inicio de los RNAm; asimismo, es capaz de activar la expresión de algunos de sus genes blanco al prevenir la formación de una estructura en el RNAm que impide la traducción o que favorece su degradación.

BarA/SirA y Csr son sistemas de regulación global que en diversas proteobacterias controlan la expresión de genes para diferentes funciones, como metabolismo del

carbono, formación de biofilm, movilidad, quorum sensing y virulencia (Tabla 1) (Vakulskas *et al.*, 2015).

Tabla 1. Ortólogos de los sistemas BarA/SirA y Csr en diversas proteobacterias

Organismo	Sistema de dos componentes	Proteína de Unión a RNA	RNA pequeños	Fenotipo regulado
<i>Escherichia coli</i>	BarA/UvrY	CsrA	CsrB, CsrC	Metabolismo del carbono, tamaño celular y propiedades de superficie
<i>Salmonella Typhimurium</i>	BarA/SirA	CsrA	CsrB, CsrC	Virulencia, movilidad, metabolismo del carbono
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GacS/GacA	RsmA	RsmY, RsmZ	SST3 y 6, quorum sensing, formación de biofilm, pili tipo IV
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GacS/GacA	RsmA, RsmE	RsmX, RsmY, RsmZ	Movilidad, factores de biocontrol
<i>Legionella pneumophila</i>	LetS/LetA	CsrA	RsmX, RsmY, RsmZ	Movilidad, SST4, producción de pigmentos
<i>Vibrio cholerae</i>	VarS/VarA	CsrA	CsrB, CsrC, CsrD	Quorum sensing, formación de biofilm
<i>Azotobacter vinelandii</i>	GacS/GacA	RsmA	RsmY, RsmZ1-8	Síntesis de alginato y PHB
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	BarA/UvrY	CsrA	CsrB, CsrC	Virulencia
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	GacS(ExpS)/GacA (ExpA)	RsmA	RsmB	Exoenzimas de degradación de pared celular
<i>Xanthomonas spp.</i>	-	RsmA	-	Movilidad, SST3, exoenzimas
<i>Pseudomonas syringae</i>	GacS/GacA	RsmA	RsmB, RsmX1-5, RsmY, RsmZ	Movilidad, factores de virulencia de secreción
<i>Bacillus subtilis</i>	-	CsrA	-	Movilidad

Adaptado de Vakulskas *et al.*, 2015

Generalidades de los sistemas BarA/SirA y Csr

BarA (por “Bacterial adaptive response”), una proteína de 918 aminoácidos, es un miembro de proteínas transmembranales histidina-cinasa tripartitas que catalizan la fosforilación de su regulador de respuesta a través de un mecanismo de fosforelevo (ATP-His³⁰²-Asp⁷¹⁸-His⁸⁶¹) (Nagasawa *et al.*, 1992; Altier *et al.*, 2000a). El regulador de respuesta SirA (por “*Salmonella* invasion regulator”), una proteína de 234 aminoácidos, es miembro de la familia NarL/FixJ de proteínas de unión a DNA, que contiene un dominio receptor de la fosforilación en el amino terminal (Asp⁵⁴) y un dominio hélice-vuelta-hélice en su carboxilo terminal (Johnston *et al.*, 1996;

Pernestig *et al.*, 2001). Aunque tanto *uvrY* (ortólogo de *sirA* en *E. coli*; ver Tabla 1) como sus ortólogos se encuentran codificados corriente arriba de *uvrC*, que codifica para un componente del sistema UvrABC, el cual funciona en la reparación del DNA por daño a UV, UvrY no tiene ningún efecto relacionado a la reparación del DNA (Moolenaar *et al.*, 1987).

En *Salmonella*, se describió que cepas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta barA$ están afectadas en la invasión de la bacteria a células HEp-2, debido a que están afectadas en la expresión de los genes de SPI-1 (Johnston *et al.*, 1996; Altier *et al.*, 2000a). En *S. Typhimurium*, se demostró que SirA actúa como dímero al unirse a una secuencia invertida repetida de 18 nucleótidos (TGTGAGAGATCTCTTACA), conservada en la región reguladora de *csrB* y parcialmente conservada en *csrC* (Martínez *et al.*, 2014; Zere *et al.*, 2015). Así, de esta manera, SirA regula la expresión de CsrB y CsrC, los cuales son antagonistas de la proteína de unión a RNA CsrA (Vakulskas *et al.*, 2015).

CsrA (“Carbon storage regulator”) es una proteína de 61 aminoácidos que contiene en su estructura 5 hojas β plegada y un α -hélice en su C-terminal y, actúa como dímero (Gutiérrez *et al.*, 2005). Se ha determinado que CsrA se une a la secuencia RUACARGGAUGU (R= A o G) en los RNAm, la cual se localiza en estructuras cortas de tipo tallo-asa como las que contienen CsrB y CsrC (Dubey *et al.*, 2005). De hecho, CsrB fue encontrado en *E. coli* en un complejo ribonucleoproteico al tratar de purificar a CsrA-His6 (Liu *et al.*, 1997). En ese estudio, se encontró que *csrB* codifica para un sRNA de ~350 nucleótidos (369 y 363 nucleótidos en *E. coli* y *Salmonella*, respectivamente), que contiene 18 estructuras tipo tallo-asa con el motivo GGA en regiones de cadena sencilla, el cual es capaz de unir aproximadamente 9 dímeros de la proteína CsrA. De esta manera, CsrB mimetiza el sitio de unión de CsrA sobre los RNAm blanco y modifica la concentración de CsrA libre en la célula (Liu *et al.*, 1997; Altier *et al.*, 2000a). Más aún, la sobreexpresión de CsrB induce la acumulación de glucógeno en la célula, siendo este proceso reprimido por CsrA en la fase estacionaria (Liu *et al.*, 1997). De igual manera, se encontró que CsrC también es un regulador positivo de la síntesis de glucógeno (Weilbacher *et al.*, 2003; Fortune *et al.*, 2006). Este sRNA de ~250 nucleótidos (245 y 244 nucleótidos en *E. coli* y *Salmonella*, respectivamente), contiene 9 estructuras tipo tallo-asa con el motivo GGA en regiones de cadena sencilla, el cual es capaz de unir aproximadamente 4 dímeros de CsrA.

La proteína CsrA fue descrita primeramente en *E. coli*, mediante el estudio de procesos que se inducen en una fase estacionaria de crecimiento; entre ellos se encuentra la glucogénesis. Este proceso es regulado negativamente por CsrA debido a que se une al transcrito de *glgC*, reprimiendo así su expresión y favoreciendo su degradación (Liu *et al.*, 1995; Vakulskas *et al.*, 2015). Así también,

reprime la traducción de algunas enzimas que participan en la gluconeogénesis (*pckA*, *fbp*, *pps* y *pgm*) y activa a algunas de la glucólisis (*pgi*, *pfkA*, *pfkB*, *tpi*, *eno*, *pykF*) (Sabnis *et al.*, 1995; Romeo, 1998).

Se ha descrito también que CsrA, tanto en *E. coli* como en *Salmonella*, induce positivamente la formación del flagelo al unirse y estabilizar al transcrito de *flhDC*, que codifica el regulador central de los genes flagelares (Wei *et al.*, 2001; Lawhon *et al.*, 2003). Sin embargo, en *E. carotovora* y *P. fluorescens*, RsmA (“Repressor of secondary metabolites”, ortólogo de CsrA), reprime la formación de flagelo y, por lo tanto, la movilidad (Mukherjee *et al.*, 1996; Goodier & Ahmer; 2001).

De manera interesante, en *B. subtilis* CsrA también regula la formación del flagelo mediante un mecanismo diferente e independiente de los sRNAs CsrB/C (Mukherjee *et al.*, 2011). En esta bacteria, se encontró el primer antagonista de CsrA de identidad proteica, FliW, la cual, junto con CsrA, regula la expresión de la flagelina Hag. Una vez que el cuerpo basal y el gancho del flagelo se forman, FliW secuestra a CsrA del transcrito de *hag*, y así Hag se expresa y se secreta a través del cuerpo basal para formar el filamento del flagelo. Enseguida, la proteína Hag del citoplasma secuestra a FliW del complejo FliW-CsrA, lo que permite que CsrA reprima nuevamente la expresión de *hag*. A diferencia de CsrB/C, FliW no se une a los residuos que utiliza CsrA para unirse a los RNAm (Mukherjee *et al.*, 2016). Dentro del mismo estudio se realizó un análisis de la distribución filogenética de CsrA, el cual sugiere que la regulación de la formación del flagelo a través de CsrA es ancestral, pero cuando se adquirió el gen *csrA* durante la evolución en las γ -proteobacterias, la bacteria adaptó a CsrA para regular otros procesos fisiológicos (Mukherjee *et al.*, 2011).

Otro de los procesos que regula CsrA es la formación de biofilm (Vakulskas *et al.*, 2015). En *E. coli*, CsrA reprime la expresión de *pgaABCD*, el cual codifica para el polisacárido PGA que estabiliza la estructura del biofilm (Wang *et al.*, 2005).

El sistema Csr también regula genes de virulencia en diversas bacterias patógenas (Vakulskas *et al.*, 2015). En *Salmonella*, una cepa que carece de los genes *barA*, *sirA* o *csrB* tiene defectos en la invasión de la bacteria a células HEp-2; esto debido a que CsrA se une y reprime la expresión de *hilD*, que codifica para el regulador positivo de los genes de SPI-1 (Altier *et al.*, 2000a,b; Martínez *et al.*, 2011). Adicionalmente, se ha descrito que CsrA regula positivamente la expresión de la fimbria Pef, necesaria para la adhesión de la bacteria al intestino delgado de roedores (Bäumler *et al.*, 1996; Sterzenbach *et al.*, 2013).

Se ha descrito que existen variaciones en el número de componentes de los ortólogos los sistemas BarA/SirA y Csr entre las diversas bacterias (Tabla 1). En *P.*

fluorescens, hay un parálogo de RsmA (CsrA), RsmE, el cual es también capaz de unirse a RsmY/Z (ortólogos de CsrB/C) (Reimann *et al.*, 2005). Además, existe otro sRNA llamado RsmX, que también es activado a través del sistema GacS/GacA (BarA/SirA) y es capaz de unirse a RsmA/E (Kay *et al.*, 2005). Además de los componentes RsmXYZ presentes en *P. syringae*, mediante un análisis bioinformático se encontró a 5 parálogos de la familia RsmX (RsmX1-5) (Moll *et al.*, 2010). Más aún, en *A. vinelandii* se han descrito 9 sRNAs, 8 de la familia RsmZ (Rsm1-8) y 1 de la familia RsmY; estos regulan positivamente la expresión de *algD*, que codifica para la GDP-manosa deshidrogenasa involucrada en la biosíntesis del alginato (Manzo *et al.*, 2011; Castañeda *et al.*, 2016).

Por otra parte, se han hecho esfuerzos para determinar la señal que activa a BarA/UvrY (BarA/SirA) y, por lo tanto, la expresión de CsrB/C (Lawhon *et al.*, 2002; Chavez *et al.*, 2010). Un estudio en *Salmonella* indicó que la adición de acetato al medio (pero no de otros ácidos grasos de cadena corta como el propionato y butirato) en concentraciones y pH similares a las encontradas en el íleon distal (región del intestino donde *Salmonella* invade), es capaz de restaurar la expresión de *hilA*, *invF* y *sipC* (genes de SPI-1) en una cepa $\Delta barA$; no obstante, los autores proponen que el acetato podría actuar a través de BarA (Lawhon *et al.*, 2002). En *E. coli*, también se demostró que el acetato es capaz de activar la expresión de CsrB a través de UvrY (SirA), pero ellos también proponen que el acetato actúa también a través de BarA; asimismo, otros ácidos grasos de cadena corta, como formato, propionato, butirato, valerato y caproato, actúan a través de BarA (Chavez *et al.*, 2010). Sin embargo, se requieren de más estudios para determinar el mecanismo por el cual estos compuestos son detectados.

A su vez, los niveles de CsrA aumentan cuando las células llevan a cabo la transición entre la fase exponencial y estacionaria de crecimiento (Vakulskas *et al.*, 2016), incidiendo así en los procesos que son desencadenados en la entrada de la fase estacionaria de crecimiento (Leng *et al.*, 2016). Adicionalmente, una cepa de *E. coli* o de *Salmonella* que carece de *csrA* presenta defectos en el crecimiento (Lawhon *et al.*, 2003; Timmermans & Van Melderren, 2009).

Regulación de los sistemas BarA/SirA y Csr

El sistema de regulación global Csr es controlado por una compleja red de regulación. Yakhnin y colaboradores encontraron que la transcripción de *csrA* es mediada por 5 promotores (P1 a 5), de los cuales P1 y P3 son activados por el factor σ^S , mientras que P2 y P5 son activados por el factor σ^{70} . (Yakhnin *et al.*, 2011). Además, la transcripción de *csrA* se activa indirectamente por CsrA a través del P3; asimismo, CsrA también es capaz de reprimir su propia traducción al unirse a su transcrito.

En *E. coli*, CsrA modula su propia actividad al regular de manera indirecta la expresión de CsrB y CsrC, a través del sistema BarA/UvrY (Suzuki *et al.*, 2002; Camacho *et al.*, 2015). CsrA regula de manera indirecta la expresión de UvrY a nivel transcripcional y traduccional, así como también regula el cambio de la actividad fosfatasa de BarA a su actividad cinasa, lo cual permite que UvrY se fosforile a través de BarA y que active la expresión de CsrB/C. Por ello, en una cepa mutante en *csrA*, los niveles de CsrB se disminuyen drásticamente (Gudapaty *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002). Cabe destacar que en ausencia de *csrB* o *csrC* existe un mecanismo de compensación que permite elevar los niveles de CsrC o CsrB, respectivamente, tanto en *E. coli* como en *Salmonella* (Weilbacher *et al.*, 2003; Fortune *et al.*, 2006).

Por otra parte, se ha descrito que en *E. coli* existe una conexión entre el sistema Csr y la respuesta estricta, ya que el factor transcripcional DksA y la alarmona (p)ppGpp activan la expresión de *csrB* y *csrC* de manera indirecta, posiblemente mediante una interacción con UvrY (Edwards *et al.*, 2011). Además, dos helicasas de RNA de tipo DeaD-box, DeaD y SrmB, tienen un efecto positivo en la expresión de CsrB en *E. coli*. DeaD induce la expresión de CsrB a través de UvrY, mientras que SrmB induce su expresión indirectamente a través de otra proteína (Vakulskas *et al.*, 2014).

En *E. coli*, la proteína CsrD (YhdA) regula la actividad de CsrA, debido a que hace susceptible específicamente a CsrB y CsrC a la degradación por la RNasa E (principal endonucleasa involucrada en la degradación de RNAm), pero no así a otros blancos de la RNasa E (Suzuki *et al.*, 2006). Debido a que CsrD contiene dominios GGDEF (diguanylatos ciclasas) y EAL (c-di-GMP fosfodiesterasas) degenerados, la degradación que ejerce sobre CsrB/C es independiente del segundo mensajero c-di-GMP, probablemente debido a una pérdida de la función de estos dominios en el metabolismo de c-di-GMP (Suzuki *et al.*, 2006). Recientemente, se ha descrito que CsrA al unirse a CsrB, evita la degradación de este sRNA a través de la RNasa E; sin embargo, CsrD compite por algunos de los sitios a los que CsrA se une en este sRNA para inducir la degradación de CsrB (Vakulskas *et al.*, 2016). Además, CsrA regula negativamente la expresión de CsrD al unirse sobre su RNAm, lo que indica la presencia de otro mecanismo de autoregulación de CsrA (Jonas *et al.*, 2010).

Recientemente, en *E. coli* se demostró que la unión de la proteína EIIGlc del sistema PTS (“phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system”) al dominio EAL de CsrD favorece la degradación de CsrB y CsrC (Leng *et al.*, 2016). El sistema PTS es un complejo de proteínas que acoplan el transporte de carbohidratos con la (des-)fosforilación de las proteínas que comprenden el sistema;

si está presente la glucosa en el medio, la proteína EIIA^{Glc} está en su estado desfosforilado, pero en presencia de otra fuente de carbono, EIIA^{Glc} se encuentra en su estado fosforilado (P-EIIA^{Glc}) y promueve la producción de cAMP, el cual se une a CRP y activan la expresión de genes involucrados en la utilización de fuentes alternativas de carbono (Deutscher *et al.*, 2014). De manera interesante, Leng y colaboradores demostraron que el decaimiento de CsrB y CsrC aumenta al añadir glucosa al medio, lo que sugiere que el sistema PTS podría actuar como un sensor de glucosa del sistema Csr.

Adicionalmente, el complejo cAMP-CRP formado en ausencia de glucosa, aumenta ligeramente la vida media de CsrB y CsrC (Leng *et al.*, 2016). Sin embargo, también se demostró que el complejo cAMP-CRP disminuye la expresión de *csrB* y *csrC* de manera indirecta y directa, respectivamente (Pannuri *et al.*, 2016). Si bien, el complejo cAMP-CRP tiene efectos en ambos procesos de síntesis y degradación de CsrB/C en *E. coli*, este mecanismo es probablemente una manera de generar una respuesta rápida a los cambios en el medio ambiente (Panuri *et al.*, 2016). Sin embargo, a diferencia de *E. coli*, en *S. Typhimurium*, el complejo cAMP-CRP induce la expresión de CsrB y CsrC a través de SirA (Teplitski *et al.*, 2006).

Por otra parte, tanto en *E. coli* como en *Salmonella*, *csrB* (pero no *csrC*) también es regulado positivamente por la proteína asociada al nucleoide, IHF (Martínez *et al.*, 2014; Zere *et al.*, 2015). Adicionalmente, en *Salmonella*, SsrB, regulador de los genes de SPI-2, es capaz de reprimir la expresión de *csrB*, pero no la de *csrC* (datos no publicados de nuestro grupo).

El sistema de regulación por retroalimentación negativa que gobierna a CsrA, permite controlar su actividad (es decir, la concentración de CsrA libre en la célula) para contender con los cambios rápidos presentes en diversos ambientes (Adamson & Lim, 2013). Aunque este complejo mecanismo de autoregulación del sistema Csr ha sido ampliamente estudiado en *E. coli*, probablemente esté presente en las demás especies de la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo a *Salmonella*.

ANTECEDENTES

En un estudio previo de análisis de transcriptomas, se encontró que CsrA afecta la transcripción de muchos genes en *S. Typhimurium*, como los genes de SPI-1 y otros genes de virulencia, genes necesarios para la síntesis del flagelo, para la quimiotaxis, para la síntesis y utilización de vitamina B₁₂ y el operón de maltosa (Lawhon *et al.*, 2003). Sin embargo, la mutante de *S. Typhimurium* que carece de CsrA está afectada en el crecimiento, lo cual complica la comparación de la expresión genética entre la cepa WT y la mutante $\Delta csrA$. Asimismo, el sistema Csr regula la expresión de sus genes blanco principalmente a nivel postranscripcional. Así, para determinar mejor el efecto global en la expresión genética de los sistemas BarA/SirA y Csr en *S. Typhimurium*, se requiere de estudios a nivel postranscripcional, donde se analice la ausencia de la proteína SirA o los sRNAs CsrB y CsrC, lo cual no afecta el crecimiento de esta bacteria.

Por otro lado, Zere y colaboradores realizaron un análisis de ChIP-seq (inmunoprecipitación de la cromatina y secuenciación) para determinar los sitios de unión de SirA y UvrY en el genoma de *S. Typhimurium* y *E. coli* (Zere *et al.*, 2015). En dicho estudio se encontró que SirA/UvrY se unen principalmente a las regiones reguladoras de *csrB* y *csrC*; sin embargo, también se encontró que se unen a algunos otros genes, aunque al parecer con menor afinidad. Esto sugiere que SirA/UvrY actúan, en *S. Typhimurium* y *E. coli*, principalmente a través de CsrB y CsrC, pero que también SirA/UvrY podrían actuar directamente, de manera independiente a estos sRNAs. Para determinar si SirA puede actuar de manera dependiente e independiente de CsrB y CsrC, se requiere de un análisis de expresión global, a nivel postranscripcional, comparando el efecto de la ausencia de SirA con el de la ausencia de CsrB y CsrC.

Por otra parte, en nuestro grupo se encontró que BarA/SirA y Csr controlan a nivel traduccional la expresión de HilD, cuando se crece a *S. Typhimurium* en medio LB (Martínez *et al.*, 2011). Consistente con esto, se encontró que CsrA se une a sitios que se superponen sobre la secuencia SD y el codón de inicio de *hilD*. De manera interesante, la expresión de los genes de SPI-1 se afecta drásticamente en mutantes que carecen de SirA o de ambos CsrB y CsrC, pero no se afecta significativamente en mutantes que carecen sólo de CsrB o CsrC. Con base en estos resultados se concluyó que SirA regula a *hilD*, y así a los genes de SPI-1, a través de CsrB y CsrC. El hecho de que la expresión de los genes de SPI-1 se afecte en ausencia de ambos CsrB y CsrC, pero no en la ausencia de sólo uno de estos sRNAs, sugiere que CsrB y CsrC podrían tener una función redundante para estos genes. Debido a esto, el efecto más claro sobre la regulación de los genes por los

sistemas BarA/SirA y Csr, será el provisto por la ausencia de SirA y por la ausencia de CsrB y CsrC en un estudio de expresión global.

En este proyecto nos hemos planteado las siguientes preguntas: ¿Existen otros genes regulados por el sistema BarA/SirA y Csr que no han sido descritos en *S. Typhimurium*? y ¿El sistema BarA/SirA actúa principalmente a través de CsrB y CsrC en *S. Typhimurium*? Para contestar estas preguntas realizamos un análisis a nivel proteómico de los sistemas BarA/SirA y CsrB/C de *S. Typhimurium*, en condiciones de crecimiento en las cuales se induce la expresión de genes de virulencia y se ha determinado que los sistemas BarA/SirA y CsrB/C son activos en esta bacteria. Para esto, se obtuvieron y compararon perfiles proteómicos de la cepa WT, de una cepa mutante que carece del gen *sirA* y de una cepa mutante que carece de ambos genes *csrB* y *csrC*, crecidas en medio LB a 37°C hasta una OD_{600nm} de 1.4.

Una de las líneas de investigación de nuestro grupo es la de determinar la función de genes hipotéticos y putativos de *S. Typhimurium*; así, con el presente trabajo esperamos identificar nuevos genes regulados por los sistemas BarA/SirA y Csr. Esto nos permitirá analizar la posible función de genes aún no caracterizados regulados por BarA/SirA y Csr, en los fenotipos regulados por estos sistemas, como virulencia y movilidad.

HIPÓTESIS

En *S. Typhimurium*, el sistema BarA/SirA regula la expresión de sus genes blanco conocidos, así como la de otros aún no identificados, actuando a través de los RNA pequeños CsrB y CsrC.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el papel de los sistemas de regulación BarA/SirA y Csr en la virulencia y fisiología de *S. Typhimurium*.

Objetivos específicos

- 1.- Identificar nuevos genes regulados por los sistemas BarA/SirA y Csr
- 2.- Determinar si el sistema BarA/SirA actúa principalmente a través de los sRNAs CsrB y CsrC
- 3.- Evaluar si algunos de los posibles genes identificados que son regulados por BarA/SirA y Csr tienen un papel en invasión, replicación intracelular o movilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas, plásmidos, oligonucleótidos y antibióticos usados en este estudio se enlistan en las tablas 2, 3, 4 y 5.

Tabla 2. Cepas bacterianas usadas en este estudio

Cepa	Descripción	Referencia o fuente
S. Typhimurium		
WT	Cepa WT SL1344; <i>xyl</i> , <i>hisG</i> , <i>rpsL</i> ; Stp ^R	Hoiseth & Stocker, 1981
14028s	Cepa WT 14028s	ATCC
Δ <i>sirA</i> ::Km	Derivada de SL1344; Stp ^R , Km ^R	Martínez <i>et al.</i> , 2011
Δ <i>csrB</i> ::Km	Derivada de SL1344; Stp ^R , Km ^R	Martínez <i>et al.</i> , 2011
Δ <i>csrC</i> ::Km	Derivada de SL1344; Stp ^R , Km ^R	Martínez <i>et al.</i> , 2011
Δ <i>csrB</i>	Derivada de Δ <i>csrB</i> :: Km; Stp ^R	Martínez <i>et al.</i> , 2011
Δ <i>csrB</i> Δ <i>csrC</i> ::Km	Derivada de Δ <i>csrB</i> ; Stp ^R , Km ^R	Martínez <i>et al.</i> , 2011
Δ <i>csrB</i> Δ <i>csrC</i>	Derivada de Δ <i>csrB</i> Δ <i>csrC</i> :: Km; Stp ^R	Bustamante V., datos no publicados
Δ <i>csrC</i>	Derivada de Δ <i>csrC</i> :: Km; Stp ^R	Este estudio
<i>hilE</i> -FLAG	Derivada de 14028s; expresa la proteína HilE-FLAG; Stp ^R , Km ^R	Bustamante V., datos no publicados
<i>yebF</i> -FLAG	Derivada de SL1344; expresa la proteína YebF-FLAG; Stp ^R , Km ^R	Este estudio
ρ K3-SL1770-FLAG	Derivada de SL1344; expresa la proteína SL1770-FLAG, a partir del promotor del plásmido pMPM-K3; Stp ^R , Km ^R	Banda <i>et al.</i> , datos no publicados
Δ <i>yebF</i> ::Km	Derivada de SL1344; Stp ^R , Km ^R	Este estudio
Δ <i>flhDC</i> ::Km	Derivada de SL1344; Stp ^R , Km ^R	Martínez-Flores <i>et al.</i> , 2016
Δ <i>hilD</i> ::Km	Derivada de SL1344; Stp ^R , Km ^R	Bustamante <i>et al.</i> , 2008
Δ <i>ssrB</i> ::Km	Derivada de SL1344; Stp ^R , Km ^R	Worley <i>et al.</i> , 2000
E. coli		
DH5 α	Cepa de laboratorio, Nal ^R	Invitrogen
DH10 β	Cepa de laboratorio, Stp ^R	Invitrogen

Tabla 3. Plásmidos usados en este estudio

Plásmidos	Descripción	Referencia o fuente
pFLP3	Vector que expresa la recombinasa FLP; Amp ^R	Choi <i>et al.</i> , 2005
pRS414	Vector derivado de pRS415 y pMC1403 para construir fusiones traduccionales a <i>lacZ</i> ; Amp ^R	Simons <i>et al.</i> , 1987
philE-lacZ	Plásmido derivado de pRS414 que contiene la fusión traduccional <i>hilE-lacZ</i> desde los nucleótidos -424 a +49	Paredes C., datos no publicados
pydcJ-lacZ	Plásmido derivado de pRS414 que contiene la fusión traduccional <i>ycdJ-lacZ</i> desde los nucleótidos -333 a +35	Este estudio
pyebF-lacZ	Plásmido derivado de pRS414 que contiene la fusión traduccional <i>yebF-lacZ</i> desde los nucleótidos -104 a +32	Este estudio

pSLP2_0011-lacZ	Plásmido derivado de pRS414 que contiene la fusión traduccional <i>SLP2_0011-lacZ</i> desde los nucleótidos -397 a +65	Este estudio
pSL2374-lacZ	Plásmido derivado de pRS414 que contiene la fusión traduccional <i>SL2374-lacZ</i> desde los nucleótidos -232 a +44	Este estudio
pcbi-lacZ	Plásmido derivado de pRS414 que contiene la fusión traduccional <i>cbiABCDEFGHIJKLMNQOPcobUST-lacZ</i> desde los nucleótidos -576 a +47 de <i>cbiA</i>	Este estudio
pyqcC-lacZ	Plásmido derivado de pRS414 que contiene la fusión traduccional <i>yqcC-lacZ</i> desde los nucleótidos -183 a +29	Este estudio
pMPM-K3	Vector de clonación de bajo número de copias derivado de p15A, contiene el promotor <i>lac</i> ; Km ^R	Mayer, 1995
pK3-CsrA	Plásmido derivado de pMPM-K3, expresa a CsrA bajo el promotor <i>lac</i>	Martínez <i>et al.</i> , 2011
pK3-CsrB	Plásmido derivado de pMPM-K3, expresa a CsrB bajo el promotor <i>lac</i>	Martínez <i>et al.</i> , 2011
pKD4	Derivado de pANTSy; contiene el gen de resistencia a Km, flanqueado por FRT's	Datsenko & Wanner, 2000
pKD46	Derivado de pINT-ts, contiene el sistema de recombinación del fago λRojo bajo el promotor inducible por arabinosa; sensible a una temperatura mayor a 30°C; Amp ^R	Datsenko & Wanner, 2000
pSUB11	Vector templado para el etiquetado de genes con la secuencia que codifica el epítopo 3XFLAG; contiene además el gen de resistencia a Km, flanqueado por FRT's	Uzzau <i>et al.</i> , 2001

Nota: Las posiciones mencionadas en las fusiones traduccionales, son con respecto al codón de inicio de la traducción del respectivo gen.

Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este estudio

Nombre	Secuencia (5'-3')	Gen blanco
Para caracterizar mutantes o etiquetas a FLAG		
SirAFpMPMT3	CAT AAG CTT CAA AAA CGA GAG CAA AAT CG	<i>sirA</i>
SirARpMPMT3	TAA GGA TCC GTA CCG CCG GCG TCA TAC	
CsrB-F/Kpn1	AGC CGG TAC CTT TTG AAG GCG AAG AAA ATG	<i>csrB</i>
CsrB-R	GCA GCA GCG TTT CAA GCG	
CsrCF	GAC CAT TGC ACT TAT GCG AC	<i>csrC</i>
CsrCR	AGG CGT TTA CGG TCG CGC	
K1	CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT	<i>Km (kanamicina)</i>
K2	CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC	
HilE-Kpn-5'	AGC GGT ACC TCG GTA TTT AAT CTG GTA TAC AG	<i>hilE</i>
HilE-HindIII-3'	TCC GCA AGC TTG TTT TGT CC	
yebF-R	CCA TAG TAC CCC TCA AAT ACA G	<i>yebF</i>
Para fusiones traduccionales a <i>lacZ</i>		
ydcJ-FwBamHI	CTT GGA TCC CGC AAC CGA ATG CGC TGA CT	<i>ydcJ</i>
ydcJ-RvBamHI	CCT GGA TCC TCC CGA ATC TCA TCT GCC GTG	
yebF-FwEcoRI	GCG AAT TCG GAC GCC GCG AGT AAA ACG	<i>yebF</i>
yebF-RvBamHI	CCT GGA TCC AGC AGG CTC AAC AAC GCT CC	
P2_11-FwEcoRI	GCG AAT TCA CCA CAA TGA CGG GAG TTT TCC T	<i>SLP2_0011</i>
P2_11-RvBamHI	CCT GGA TCC TCC TCA CTG CTA AGC TCC CG	

lacZ Rev-11	GGC GAT TAA GTT GGG TAA CGC	<i>lacZ</i> (vector pRS414)
SL2374-FwEcoRI	GCG AAT <u>TCC</u> ATC CTG CCA GTC TGT CCA G	SL2374
SL2374-RvBamHI	CCT GGA <u>TCC</u> CGA TAC TCC ATT GTG TGA TAA CG	
cbiAP-FwEcoRI	CCT GAA <u>TTC</u> TCA TCC TCC ATC GTT ATG	<i>cbiA</i>
cbiAP-RvBamHI	CCT GGA <u>TCC</u> CAA CCG CTT CCT GTG CCT GC	
yqcCB-FwEcoRI	CCT GAA <u>TTC</u> GTG CGC AGG ATG CAA ACG TTC	<i>yqcC</i>
yqcCB-RvBamHI	CCT GGA <u>TCC</u> AAC TGC TGA CGC ACA CGG TC	
Para construir la mutante $\Delta yebF::Km$		
yebFH1P1	CTG AAT CAT TGT GCT AAG GAG AAA AGT ATG AAT AAA AGA GGA <u>TGT</u> AGG CTG GAG CTG CTT CG	<i>yebF</i>
yebFH2P2	CCG GCA AAA GAA GCG CAA ATT ACG CTG CTA GCG GGG CTT ATA <u>CAT</u> ATG AAT ATC CTC CTT AG	
Para construir la cepa <i>yebF</i>-FLAG		
yebF-FLAGFw	ATC GTT GAT TGC AAA GCC GGC AAG GCG GAA TAT AAG CCC CGC <u>GAC</u> TAC AAA GAC CAT GAC GG	<i>yebF</i>
yebF-FLAGRv	CAG GAA TTG TCT GTT CCG GCA AAA GAA GCG CAA ATT ACG CTG <u>CAT</u> ATG AAT ATC CTC CTT AG	

Nota: En letras cursivas se muestra el sitio de corte en enzimas de restricción creado dentro del oligonucleótido. La secuencia que corresponde al plásmido templado pKD4 o pSUB11 se muestra subrayada.

Tabla 5. Antibióticos y dosis empleadas en este estudio

Antibiótico	Dosis
Estreptomina (Stp)	100 µg/ml
Ampicilina (Amp)	200 µg/ml
Kanamicina (Km)	30 µg/ml
Ácido Nalidixico (Nal)	15 µg/ml

Preparación de muestras para el análisis por LC-MS/MS

Para el análisis proteómico se requirió extraer las proteínas totales solubles de la cepa WT de *S. Typhimurium* y sus derivadas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, cada una por triplicado. Primero, se preparó un pre-inóculo de las cepas en 5 ml de medio LB y se incubó a 37°C y 200 rpm durante toda la noche. Entonces, se inocularon matraces con 50 ml de medio LB a partir de 500 µl del pre-inóculo; se incubaron a 37°C y 200 rpm en un baño maría hasta una OD_{600nm} de 1.4. Enseguida, se centrifugaron 25 ml del cultivo en tubos Falcon de 50 ml estériles a 4,000 rpm durante 8 min a 4°C. La pastilla de células se lavó con 10 ml de buffer de fosfatos 10mM pH 7.4 frío; se mezcló suavemente y se centrifugó a 4,000 rpm durante 8 min a 4°C. Después, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de células en 4 ml de buffer de fosfatos 10 mM pH 7.4 frío. Posteriormente, las células se sonicaron durante 4 min en un sonicador “Vibra Cell”, con pulsos de 9 s y periodos de reposo de 9 s entre cada pulso. Las muestras sonicadas se centrifugaron a

13,000 rpm durante 30 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a tubos “Ultra-Clear Centrifuge Tubes 13x51 mm no. 344057” (Beckman Coulter), y se centrifugaron a 40,000 rpm durante 1 h a 4°C en una ultracentrífuga “Optima L-90K Clase S” con el rotor “SW55 Ti” (Beckman Coulter). El sobrenadante se utilizó como la fracción soluble. Posteriormente, se cuantificó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. Se precipitaron 20 µg de proteína con 1 ml de acetona fría (Sigma), se agitaron suavemente los tubos y se incubaron a -20°C durante toda la noche. Entonces, los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 30 min y se descartó el sobrenadante; los tubos se secaron a temperatura ambiente durante 30 min. Las muestras de proteínas se almacenaron a -20°C previo al análisis por LC-MS/MS.

Análisis proteómico

Las muestras de proteínas de las cepas de *S. Typhimurium* WT, $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, fueron enviadas al “Proteomics Discovery Platform, Institut de recherches cliniques de Montréal” en Canadá. Una vez allí, las proteínas fueron digeridas con tripsina y analizadas por LC-MS/MS; después, los péptidos obtenidos fueron analizados con el software Mascot contra la base de datos “NCBI_Salmonella_enterica_serovar_Typhimurium_st_SL1344_txid216597” para identificar las proteínas presentes en las muestras.

Para validar la identificación de las proteínas obtenidas por LC-MS/MS, se utilizó el software Scaffold v.4.7.4 (Proteome Software Inc., Portland, OR). La identificación de péptidos fue aceptada si pudo establecer una probabilidad mayor de 95% por el “Peptide Prophet algorithm”. La identificación de las proteínas fue aceptada si se pudo establecer una probabilidad mayor del 99% por el “Peptide Prophet algorithm” y si se identificaron al menos 2 péptidos para la respectiva proteína. El análisis cuantitativo por “label-free” fue realizado por el método de conteo de espectros y analizado mediante el factor de abundancia espectral normalizado (NSAF). Además, se realizó un análisis por *t* de *Student* de cada cepa con tres réplicas, usando un valor de $p \leq 0.05$. Se consideró un cambio significativo, si la relación de la abundancia relativa de proteínas en $\Delta csrB \Delta csrC/WT$, $\Delta sirA/WT$ y $\Delta sirA/\Delta csrB \Delta csrC$ fue ≥ 2 ó ≤ 0.5 .

Cinética de crecimiento

Se preparó un pre-inóculo de las cepas en 5 ml de medio LB con los antibióticos correspondientes, el cual se incubó a 37°C y 200 rpm durante toda la noche. Después se inocularon matraces que contenían 50 ml LB+Stp con 500 µl del pre-inóculo; se incubaron a 37°C y 200 rpm en un baño maría y se midió la OD_{600nm} cada hora durante 8 h.

Extracción de DNA genómico y plasmídico

Para la extracción de DNA genómico (DNAg) de bacterias se utilizó el protocolo de “salting-out” modificado de Miller y colaboradores (1988), como se describe a continuación. A partir de un cultivo de bacterias de toda la noche crecidas en medio LB a 37°C, se tomaron y centrifugaron 5 ml a 13,000 rpm durante 2 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de bacterias en 570 µl de buffer Tris 10mM pH 8. Después, se agregaron 30 µl de SDS al 20% y se mezcló durante 30 s. Se incubó a 80°C durante 5 min y se enfrió a temperatura ambiente. Después, se agregaron 5 µl de RNAsa a 10 mg/ml y se incubó a 37°C durante 15 min; se enfrió a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 200 µl de NaCl 5M, se mezcló durante 30 s y se incubó en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. Después, se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se agregaron 800 µl de isopropanol; se mezcló durante 30 s. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70%; se mezcló durante 30 s y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. Se repitió el paso anterior. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se secó la pastilla de DNA con calor en un “Concentrator Centrifuge SpeedVac SC100” (Savant) durante 10 min. Para eluir el DNA, se agregaron 150 µl de agua Mili Q estéril.

Para la extracción de DNA plasmídico por kit, se utilizó el protocolo de “QIAprep spin Miniprep Kit” de QIAGEN o “Zyppy Plasmid Miniprep Kit” de Zymo Research, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la extracción de DNA plasmídico por Miniprep, se tomaron 5 ml de un cultivo de bacterias de toda la noche en medio LB a 37°C y se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de bacterias en 150 µl de buffer SET. Después, se agregaron 8 µl de RNAsa (10 mg/ml) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Entonces, se agregaron 400 µl de solución salina (NaOH 0.2M /SDS 1%), se mezcló invirtiendo los tubos y se incubó en hielo durante 5 min. Después, se agregaron 300 µl de acetato de amonio 7.5M pH 7.8, se mezcló invirtiendo los tubos y se incubó en hielo durante 10 min. Después, se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min; se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Entonces, se agregaron 500 µl de isopropanol y se mezcló invirtiendo los tubos; estos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Después, los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min, y se descartó el sobrenadante. A continuación, se agregó 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se secó la pastilla de DNA con calor en un “Concentrator Centrifuge SpeedVac SC100” (Savant) durante 10 min. Entonces, se eluyó el DNA en 50 µl de agua Mili Q estéril.

Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Los análisis de DNAg, plásmidos y productos de PCR se llevaron a cabo en geles al 1% de agarosa en buffer TAE 1X. Previo a cargar las muestras en el gel, se mezclaron con buffer de carga de DNA 5X y se utilizó como marcador de peso molecular el “Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder” (Thermo Scientific). Los geles se corrieron en buffer TAE 0.5X a 100-110 V durante 1 h aproximadamente. Al finalizar la corrida, los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio a 0.5 µg/ml y se analizaron en un transiluminador de luz UV (Sigma).

Amplificación por PCR

Para caracterizar genotípicamente las cepas mutantes, los genes etiquetados con la secuencia que codifica al epítotope 3XFLAG o para la construcción de fusiones traduccionales, se realizaron reacciones de PCR. Para ello, se hicieron stocks de cada oligonucleótido a una concentración de 25 µM y, además, se hicieron mezclas de reacción con los componentes de la Tabla 6.

Tabla 6. Componentes de la mezcla de reacción de PCR

Componentes	Concentración final
DNA templado	1-2 µl/reacción de 100 µl
Buffer PCR 10X	1X
Mezcla de dNTPs 10 mM	0.2 mM
Solución de MgCl ₂ 50 mM	0.8-1.5 mM
Oligonucleótido sentido 25 µM	0.5 µM
Oligonucleótido antisentido 25 µM	0.5 µM
Taq polimerasa	1 µl/reacción de 100 µl
Agua Mili Q estéril	Variable

Nota: Las mezclas de reacción se hicieron mezclando únicamente el buffer de PCR 10X, los dNTPs, el MgCl₂, la enzima Taq polimerasa y el agua. Los demás componentes se agregaron directamente a cada tubo de PCR.

Dependiendo del fragmento a amplificar, así como la T_m de los oligos empleados, las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 95°C durante 5 min; 25-30 ciclos de: 95°C durante 1 min, 52-61°C durante 1 min y 72°C durante 1-3 min; 1 ciclo de 72°C durante 5 min.

Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida

Para la detección de proteínas de perfiles de secreción de SPI-1 o de proteínas para posterior análisis por Western blot, se realizaron electroforesis de proteínas en geles al 12 y 15% de acrilamida, respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Reactivos para preparar geles de acrilamida

Reactivo	Gel separador (12%)	Gel separador (15%)	Gel concentrador (4.5%)
Acrilamida 30% / Bisacrilamida 0.8%	8 ml	10 ml	1.5 ml
Tris-HCl / SDS pH 8	5 ml	5 ml	2.5 ml
Agua milliQ	7 ml	5 ml	6 ml
PSA 10%	100 μ l	100 μ l	50 μ l
TEMED	14 μ l	14 μ l	10 μ l

Los geles se corrieron en buffer de corrida Tris-Glicina/SDS a 30 mA, durante 4 h aproximadamente. Para teñir el gel, se agregó una solución de azul de Coomassie R250 y se incubó toda la noche en agitación suave. Al día siguiente, se agregó una solución de metanol 40%/ácido acético 10% e incubó durante 3-6 h en agitación suave. Después se agregó agua destilada y se incubó durante toda la noche en agitación suave.

Perfil de secreción de SPI-1

Se inocularon tubos que contienen 5 ml de medio LB con 50 μ l de un pre-inóculo de toda la noche, cada muestra por duplicado; se incubaron a 37°C a 200 rpm durante 9 h. Se tomaron 3 muestras de 1.5 ml de cada cultivo y de sus réplicas; se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm durante 5 min. Entonces, se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se agregaron 200 μ l de ácido tricloroacético (Sigma); se agitaron los tubos con la mano y se dejaron precipitando las proteínas a 4°C durante toda la noche. Después, se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm durante 30 min; se descartó el sobrenadante y se dejó secando a temperatura ambiente durante 30 min. Las proteínas fueron resuspendidas en 30 μ l de buffer de carga de proteínas SDS-PAGE y 2 μ l de Tris-HCl 2M pH 11. Después, se juntaron los tubos de la misma muestra, se mezclaron ligeramente con vórtex y se calentaron a 95°C durante 5 min; se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Entonces, se cargaron 50 μ l de muestra en geles al 12% de acrilamida.

Preparación de células competentes para electroporación

Para la preparación de células competentes, se preparó un pre-inóculo de la cepa de interés en 5 ml de medio LB. Después, se inoculó un matraz que contiene 100 ml de medio SOB con 1 ml del pre-inoculo. Se incubó a 37°C en agitación hasta una OD_{600nm} de 0.6. Entonces, se transfirió el cultivo a tubos Falcon de 50 ml estériles y se centrifugó a 6,000 rpm durante 6 min a 4°C; se descartó el sobrenadante. Enseguida, se agregaron 30 ml de agua mQ estéril fría, se mezcló ligeramente y se centrifugó a 6,000 rpm durante 6 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se repitió

el paso anterior. Posteriormente, se agregaron 30 ml de glicerol al 10% frío, se mezcló ligeramente y se centrifugó a 6,000 rpm durante 6 min a 4°C; se resuspendió la pastilla de células en 500 µl de glicerol al 10% frío. Entonces, se agregaron 40 µl de células y 10 µl del plásmido de interés a una celda para electroporar de 0.2 cm (Biorad) y se electroporó en un MicroPulser (Biorad) a un voltaje de 1.80 kV durante 5 ms. Enseguida, se agregó 1 ml de medio SOC a la celda y se recuperó el volumen en un tubo de cultivo. Se dejaron recuperando las células a 37°C y 200 rpm durante 3 h. Se plaquearon 100-200 µl en cajas con medio LB + antibiótico correspondiente y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Construcción de mutantes o etiquetadas mediante mutagénesis

La construcción de las cepas mutantes se basa en la metodología de mutagénesis de Datsenko & Wanner (2000), donde se reemplaza el gen blanco con un casete de resistencia a Kanamicina (Km) (Figura 4). Por otra parte, la adición de una secuencia que codifica para una etiqueta se basa en una modificación del protocolo de mutagénesis descrito por Uzzau y colaboradores (2001), donde se agrega el epitope 3XFLAG en el extremo C-terminal de la proteína, por tanto, se agrega la secuencia que codifica para este epitope junto con un casete de resistencia a Km. Para ello, se amplificó por PCR el gen de resistencia a Km a partir del plásmido pKD4 ó pSUB11 para 3XFLAG-Km, empleando los oligonucleótidos que proveen la región homóloga al gen de interés. Para purificar el DNA de la reacción de PCR, se realizó el siguiente protocolo. Se agregaron 100 µl de acetato de amonio 7.5M pH 7.8, 300 µl de fenol y 300 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (50:1) a la reacción de PCR; se mezcló invirtiendo los tubos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. Se transfirió la fase acuosa a un tubo de 1.5 ml. Entonces, se agregaron 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico. Se mezcló invirtiendo los tubos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo. Posteriormente, se agregaron 800 µl de etanol absoluto a cada tubo, se agitaron e incubaron durante toda la noche a -20°C o a -70°C durante 1 hora. Entonces, se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm durante 30 min. Se desechó el sobrenadante, se agregó 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y se secaron los tubos con calor en un "Concentrator Centrifuge SpeedVac SC100" (Savant) durante 10 min. Entonces, se resuspendió el DNA en 7 µl de agua y se corrió 1 µl de DNA en un gel de agarosa para observar su integridad. Por otra parte, se realizó un pre-inóculo de la cepa *S. Typhimurium* SL1344 WT+pKD46, estriando cajas de LB+Amp, se incubó toda la noche a 30°C. Al día siguiente, se inocularon de 20-40 colonias en: 25 ml de SOB + 25 µl de Amp + 2.5 ml de L-+-arabinosa 1M; se incubó a 30°C a 200 rpm hasta una OD_{600nm} de 0.6. Después, se centrifugó a 6,000 rpm a 4°C durante 6 min. Entonces, se resuspendió la pastilla de células en 5 ml de agua fría, se centrifugó a 6,000 rpm a 4°C durante 6 min. Se descartó el

sobrenadante y este paso se repitió 2 veces más. Se resuspendieron las células en 100 µl de agua fría. Se electroporaron 3 µl de producto de PCR en 50 µl de células competentes. Después, se dejaron recuperando las bacterias en 1 ml de medio SOC a 30°C a 200 rpm durante 3 h. Entonces, se plaquearon 200 µl de células en cajas de LB+Km y se incubaron a 42°C durante toda la noche. A continuación, se rayaron 10 colonias en una caja LB+Km y se incubaron a 42°C. Se repitió este paso, pero ahora también se rayó la misma colonia en cajas LB+Amp. Las colonias que no crecieron en las cajas de LB+Amp, se tomaron de la caja de LB+Km y se inocularon en medio líquido LB+Km y LB+Amp. Se verificó por PCR que estas cepas ahora contengan el casete de resistencia a Km, con un par de oligonucleótidos externos de donde se removió el gen y con los oligonucleótidos K1 y 2 (Tabla 4).

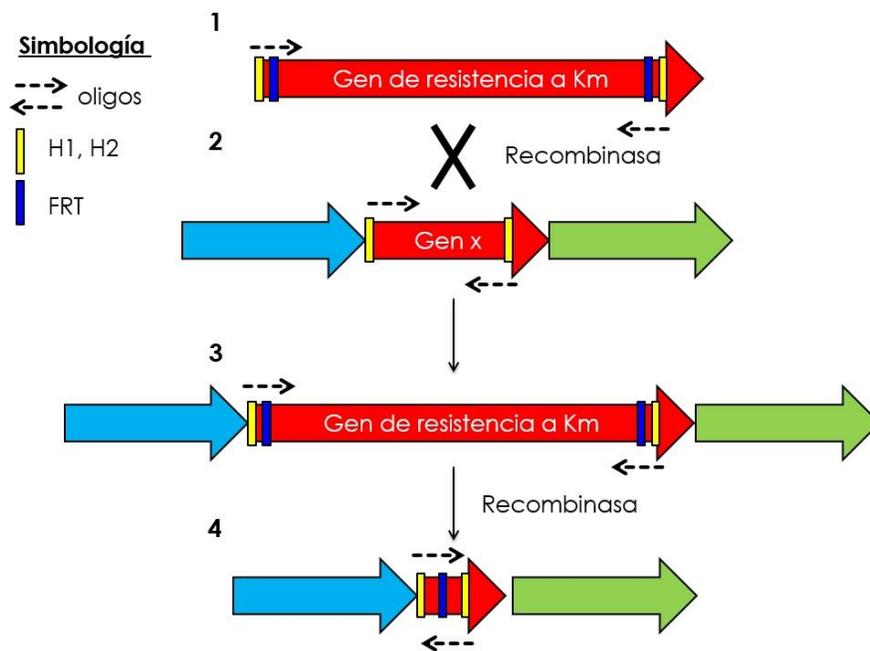


Fig. 4. Esquema general de mutagénesis. Se amplifica el gen de resistencia a Km flanqueado por los sitios de reconocimiento de la recombinasa FLP (FRT), así como una secuencia homóloga al gen de interés H1 y H2 (1) y se transforma en la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene el vector pKD46 que codifica para la recombinasa λRojo (2), entonces se obtiene la cepa donde el gen WT de interés es reemplazado por un casete de Km, y por tanto, ahora el tamaño del fragmento que amplifican los oligonucleótidos externos tienen un tamaño diferente al del gen WT (3), para eliminar el casete de Km, se transforma el plásmido pFLP3 que expresa la recombinasa FLP, y por tanto, el tamaño del fragmento que amplifican los oligonucleótidos externos tienen un tamaño menor al del gen WT (4).

Remoción del casete de resistencia a Kanamicina (Km)

Para la remoción del casete de resistencia a Km de las cepas de *S. Typhimurium* $\Delta sirA::Km$, $\Delta csrB::Km$, $\Delta csrC::Km$ y $\Delta csrB \Delta csrC::Km$, se utilizó el protocolo modificado de Datsenko & Wanner (2000), usando el plásmido pFLP3 como se describe a continuación (Figura 4). Se prepararon células competentes y se

electroporó el plásmido pFLP3 a la cepa de interés; se dejaron recuperando las bacterias a 37°C a 200 rpm durante 3 h. Entonces, se plaquearon 200-300 µl de las bacterias en cajas con medio LB+Amp, la cuales se dejaron incubando a 37°C durante toda la noche. Se tomaron 10 colonias de las transformantes obtenidas y se rayaron en cajas con medio LB sin antibiótico; se incubaron toda la noche a 37°C. Después, esas mismas colonias se rayaron en cajas con medio LB+Km; se incubaron toda la noche a 37°C. Posteriormente, se seleccionaron las colonias que no crecieron en las cajas con medio LB+Km (2-4 colonias) de las cajas de LB sin antibiótico, se inocularon en 5 ml de medio LB+Km y se incubaron a 37°C a 200 rpm durante toda la noche. Entonces, se seleccionaron las colonias que no hayan crecido en medio líquido LB+Km y se estriaron a colonia sencilla a partir de la caja de LB sin antibiótico en cajas con medio LB+10% sacarosa y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, se tomaron 10 colonias de las cajas con medio LB+10% sacarosa y se rayaron en cajas con medio LB sin antibiótico, éstas se incubaron a 37°C durante toda la noche. Entonces, estas mismas 10 colonias se rayaron en cajas con medio LB+Amp y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Después, se seleccionaron las colonias que no hayan crecido en las cajas con medio LB+Amp y se inocularon ahora en 5 ml de medio LB+Amp y 5 ml de medio LB+Amp+Km a partir de la caja de LB sin antibiótico y se incubaron a 37°C a 200 rpm durante toda la noche. Después, se seleccionaron 2-3 colonias que no crecieron en los medios anteriores, y se inocularon en 5 ml de medio LB a partir de la caja LB sin antibiótico y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se verifica por PCR que estas cepas perdieron el casete de Km, con un par de oligonucleótidos externos de donde se removió el gen y con los oligonucleótidos K1 y 2 (Tabla 4).

Transducción con el fago P22

La generación de cepas mutantes o el etiquetado de genes a través de la transducción con el fago P22, se describe a continuación. Primero se replicó el fago en células de *S. Typhimurium* WT, para esto, se preparó un inóculo de la cepa WT en 5 ml de medio LB y se incubó a 37°C a 200 rpm durante toda la noche. Después, se agregó 1 ml de medio P22 a 200 µl del pre-inoculo y se incubó a 37°C a 200 rpm durante toda la noche. Posteriormente, se transfirió el cultivo a un tubo de 1.5 ml y se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo de 1.5 ml y se añadieron varias gotas de cloroformo, se agitó por vórtex y se almacenó a 4°C. Para preparar el fago con la cepa donadora, se repitieron los pasos anteriores con la cepa que contiene el fragmento a transducir. Después, se preparó un inóculo de la cepa receptora en 5 ml de medio LB+Stp a 37°C y 200 rpm durante toda la noche. Entonces, se mezclaron las células y el fago en tubos de 1.5 ml (Tabla 8), mediante la inversión de los tubos y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Después, se agregó 1 ml de medio LB, se incubó a 37°C a 200 rpm

durante 1 h y se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla de bacterias con 200 µl de medio LB; se mezcló con vórtex y se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de bacterias en 100 µl de medio LB. Posteriormente, se plaquearon los 100 µl en cajas con medio LB+Km y se incubó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, se seleccionaron 2-3 colonias, se estriaron a colonia sencilla en cajas con medio LB+Km y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Este paso se repitió 2 veces. Después, se rayaron 2- 3 colonias en cajas con medio LB+Km y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Entonces, se inocularon esas colonias en 5 ml de medio LB+Km y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se verificó por PCR la mutación o el etiquetado de los genes, con un par de oligonucleótidos externos y con los oligonucleótidos K1 y 2 (Tabla 4).

Tabla 8. Transducción con el fago P22.

Placa	Volumen de células	Volumen de fago P22
A	200 µl	-
B	-	5 µl
C	200 µl	1 µl
D	200 µl	5 µl
E	200 µl	20 µl

Ensayos de Western blot

Se tomó una muestra de 1.5-3 ml de un cultivo de toda la noche, se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min y se resuspendieron las pastillas de bacterias en 300 µl de buffer de carga de proteínas. Después, se calentaron las muestras a 95°C durante 5 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se cargaron 50 µl de este extracto, así como 4 µl de Marcador preteñido “PAGERuler plus prestained protein ladder” (Thermo Scientific) en geles al 15% de acrilamida, los cuales se corrieron a 30 mAmp durante 4 h. Posteriormente, se cortó el gel de acuerdo al tamaño de la proteína de interés y se incubó junto con una membrana de nitrocelulosa (0.45 µm, Merck Millipore) durante 10 min en buffer de transferencia. Después, se colocó la membrana y el gel de forma apilada entre tres cuadros de papel filtro humedecido en buffer de transferencia, en una cámara “Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell” de Biorad y se transfirieron las proteínas a 15 V durante 1 h. Después de la transferencia, la membrana se incubó con la solución bloqueadora a 4°C en agitación suave durante toda la noche. Entonces, se removió la solución bloqueadora y se hicieron 3 lavados a la membrana con buffer PBST durante 15 min en agitación suave. Se incubó la membrana con el anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma) o con el anticuerpo policlonal anti-GroEL (StressGen), diluidos en PBST a 1:3,000 o 1:100,000, respectivamente, durante 3 h en agitación suave a

4°C. Posteriormente, se retiró el anticuerpo y se hicieron 3 lavados a la membrana con buffer PBST durante 15 min en agitación suave. Después, se incubó la membrana con el anticuerpo monoclonal anti-ratón o con el anticuerpo policlonal anti-conejo (Pierce), en una dilución 1:10,000 en ambos casos, durante 1 hora en agitación suave. Entonces, se retiró el anticuerpo y se hicieron 3 lavados a la membrana con buffer PBST durante 15 min en agitación suave. Posteriormente, se agregó 1.5 ml de reactivo “enhanced luminol” y 1.5 ml del reactivo “oxidizing” (PerkinElmer) a la membrana hasta cubrirla por completo. Después, la membrana se envolvió entre dos acetatos y se pegó en el casete de revelado. En el cuarto oscuro, se colocó una película radiográfica “KODAK-Omat-LS-film” sobre la membrana y se dejó exponiendo el tiempo necesario para detectar la señal (0.5-5 min). Después, la película se incubó en la solución de revelado durante 2 min y se enjuagó con agua. Entonces, se incubó la película en la solución fijadora durante 1 min y se enjuagó con agua.

Construcción de fusiones traduccionales al gen reportero *lacZ*

Para la construcción de los plásmidos *pydcJ-lacZ*, *pyebF-lacZ*, *pSLP2_0011-lacZ*, *pSL2374-lacZ*, *pcbi-lacZ*, *pyqcC-lacZ*, se amplificó mediante PCR la región intergénica, así como unos nucleótidos después del ATG (que corresponden a aproximadamente 10 codones) (Figura 5), de los genes *ydcJ*, *yebF*, *SLP2_0011*, *SL2374*, *cbi* y *yqcC*. Entonces, estos productos de PCR se purificaron con el kit “DNA Clean & Concentrator” de Zymo Research, eluyendo en 35 µl de agua MQ estéril. Entonces, se analizó el DNA en geles de agarosa al 1% y se cuantificó mediante un “NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer” (Thermo Scientific). Por otra parte, también se purificó el vector *pRS414*, se analizó en gel y se cuantificó de la misma manera. Este vector, contiene el gen *lacZ* sin promotor, el cual codifica para la enzima β-galactosidasa a partir del noveno codón. Entonces, tanto el DNA como el vector se digirieron con *EcoRI* y/o *BamHI*, o dependiendo de los sitios de corte de restricción generados en los oligos (Tabla 4). Las reacciones de digestión se realizaron por separado a 37°C durante 4 h en un volumen de reacción de 80 µl. Para esto, se agregó 1.5 µl de enzima *EcoRI* o *BamHI*, 8 µl de Buffer 10X *EcoRI* o *BamHI*, 1 µg de DNA o vector y se aforó con agua MQ estéril. Después, se purificaron los fragmentos digeridos con el kit de Zymo y se analizaron en un gel de agarosa. Posteriormente, se cuantificó nuevamente tanto el DNA como el vector y se procedió a la reacción de ligación en un volumen total de 20 µl, en el cual se utilizó una concentración de DNA:vector de 3:1 molar, 2 µl de buffer 10X T4 DNA ligasa, 1 µl de T4 DNA ligasa y se aforó con agua MQ estéril; entonces, la reacción de ligación se incubó a 16°C durante toda la noche o a 22°C durante 1-2 h. A continuación, se inactivó la enzima por calor a 65°C durante 10 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se transformó 3 µl de esta reacción en 50 µl de células

electrocompetentes de *E. coli* DH5 α . Estas fusiones se analizaron por PCR y secuenciación y después se transformaron estos plásmidos en las respectivas cepas de *S. Typhimurium*.

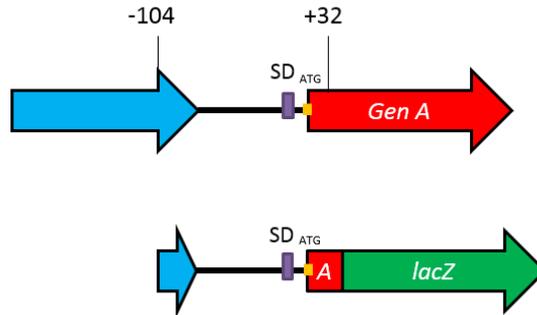


Fig. 5. Fusiones traducciónales al gen reportero *lacZ*. En el esquema se muestra la región intergénica utilizada para la construcción de la fusión traducciónal *yebF-lacZ*, contenida en el vector pRS414 que codifica para la enzima β -galactosidasa a partir del noveno codón.

Cuantificación de proteínas para la determinación de la actividad específica de β -galactosidasa

Se centrifugó 1.5 ml del cultivo de toda la noche a 13,000 rpm durante 2 min. Se descartó el sobrenadante, se lavó y resuspendió la pastilla de bacterias con 800 μ l de buffer TDTT. La pastilla de bacterias se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 min y se resuspendió nuevamente en 800 μ l de buffer TDTT. Posteriormente, las células se sonicaron durante 3 min en un sonicador "Vibra Cell", con pulsos de 10 s y periodos de reposo de 10 s entre cada pulso. Las muestras sonicadas se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 min. Enseguida, se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos. En esta fracción soluble se encuentran las proteínas totales solubles. Para la cuantificación de estas proteínas, se colocó 10 μ l de cada muestra en una placa de 96 pozos (Costar), como blanco se utilizó el buffer TDTT. Entonces, se agregaron 200 μ l de los reactivos del kit "Protein Assay Reagent" (Pierce) en una proporción de 50:1; la placa se incubó a 37°C durante 30 min. Posteriormente, se calculó la concentración de proteínas totales mediante la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm, en un lector automatizado de microplacas tipo CERES 900C (Bio-Tek Instruments Inc.), utilizando el programa KC4; los valores de absorbancia se interpolan en una curva estándar de concentración de proteínas que va de 0.1 a 1.5 mg/ml, almacenada en el programa KC4 del equipo.

Medición de la actividad β -galactosidasa

Se colocaron 20 μ l de cada muestra en una placa de 96 pozos, como blanco se utilizó el buffer TDTT. Entonces, se agregaron 200 μ l de ONPG (0.5 mg/ml

resuspendido en buffer Z 1X). La actividad β -galactosidasa se calculó inmediatamente al añadir el ONPG, utilizando el mismo lector de placas posicionado en modo cinética, donde se tomaron lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 405 nm, cada 15 s durante 5 min de reacción. Los valores de actividad obtenidos de cada muestra se interpolan en una curva estándar de actividad β -galactosidasa (de 0 a 5400 U), previamente almacenada en el programa KC4. Finalmente, la actividad específica β -galactosidasa (U/mg) se obtuvo al restar el valor del blanco y después de dividir entre la concentración de proteínas totales para cada muestra.

Ensayo de movilidad en agar

Se preparó un pre-inóculo de las cepas a estudiar en 5 ml de medio LB con los antibióticos correspondientes y se incubó a 37°C a 200 rpm durante toda la noche. Después, se inocularon matraces que contenían 20 ml de LB con 200 μ l de pre-inóculo y se incubó a 37°C a 200 rpm hasta una OD_{600nm} de 1. Entonces, se sembró 1 μ l de cultivo en agar LB al 0.3% y se incubaron las cajas a 37°C durante 6 h aproximadamente. La movilidad se determinó mediante el diámetro (cm) del halo de crecimiento alrededor del inóculo inicial.

Ensayos de invasión y replicación

Para evaluar la invasión y replicación intracelular de *Salmonella*, se usó el ensayo de protección por gentamicina. Para esto, las células HeLa (human cervical adenocarcinoma epitelial cells, ATCC) fueron crecidas en medio DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium", GIBCO 12100-046), suplementado con una solución de piruvato de sodio 10 mM (SIGMA S8636), L-glutamina 20 mM (GIBCO 25030-081) y 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (ByProductos 13001), a 37°C con 5% CO₂. Las células HeLa se sembraron 20 h antes de la infección en cajas de 24 pozos con 1x10⁵ células por pozo. Se prepararon pre-inóculos de *Salmonella* a partir de una sola colonia crecida en 3 ml de medio LB durante toda la noche a 37°C a 200 rpm. Entonces, se sub-cultivaron 600 μ l del pre-inóculo en 20 ml de medio LB y se incubaron a 37°C a 200 rpm. Estos sub-cultivos fueron diluidos (1:5) en LB hasta una OD_{600nm} de 0.6, aproximadamente después de 4 h de incubación. En este punto, se centrifugó 1 ml de cada sub-cultivo, se descartaron 900 μ l de sobrenadante y se reemplazó este volumen con PBS 1X. Entonces, se hizo una dilución 1:10 de estas suspensiones bacterianas en medio DMEM y se utilizó 10 μ l de esta dilución para infectar a las células HeLa; se incubó durante 15 min a 37°C con 5% CO₂. Enseguida, las células fueron lavadas 2 veces con PBX 1X e incubadas por 20 min adicionales con medio DMEM a 37°C con 5% CO₂. Después, las monocapas fueron incubadas con medio DMEM con 50 μ g/ml de gentamicina durante 1 h a 37°C con 5% CO₂ para eliminar bacterias extracelulares. Entonces, el medio fue removido y las células lisadas con 1 ml de deoxicolato de sodio al 0.2%.

Para el caso de replicación de 8 y 16 h, transcurrida la hora, se removió el medio y se reemplazó con DMEM con 10 µg/ml de gentamicina durante las 8 o 16 h restantes a 37°C con 5% CO₂. Los lisados celulares y los inóculos iniciales fueron diluidos de manera serial y se sembraron en cajas de LB+Stp para determinar las Unidades formadoras de colonias (UFCs).

Análisis estadístico

Los resultados de las fusiones traduccionales fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido por el test de Tukey para múltiples comparaciones, mientras que los resultados de los ensayos de invasión y replicación en células HeLa se analizaron mediante una *t* de *Student*, usando el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

RESULTADOS

Caracterización de las cepas $\Delta sirA::Km$, $\Delta csrB::Km$, $\Delta csrC::Km$ y $\Delta csrB \Delta csrC::Km$

En nuestro grupo contamos con la cepa WT de *S. Typhimurium* y sus derivadas mutantes $\Delta sirA::Km$, $\Delta csrB::Km$, $\Delta csrC::Km$ y $\Delta csrB \Delta csrC::Km$, las cuales utilizamos en este proyecto. Así, como primer paso nos planteamos la caracterización de estas cepas mediante PCR, para confirmar que tuvieran las mutaciones correspondientes. En todos los casos, se obtuvo el tamaño esperado del amplicón, el cual es diferente en las cepas mutantes comparándolo con la cepa WT (Figura 6A).

Por otra parte, se analizó también el perfil de proteínas secretadas en las cepas de *S. Typhimurium* SL1344 WT, $\Delta sirA::Km$, $\Delta csrB::Km$, $\Delta csrC::Km$ y $\Delta csrB \Delta csrC::Km$, crecidas en medio LB durante 9 h. En estas condiciones de crecimiento se secretan las proteínas SipA, SipB, SipC y SipD codificadas en SPI-1. Debido a que SirA, CsrB y CsrC regulan positivamente a los genes SPI-1 (Figura 6B) (Martínez *et al.*, 2011), como era esperado, la secreción de las proteínas SipA, SipB, SipC y SipD, codificadas en SPI-1, está reducida drásticamente en las cepas $\Delta sirA::Km$ y $\Delta csrB \Delta csrC::Km$ en comparación con la cepa WT y no así en las cepas $\Delta csrB::Km$ y $\Delta csrC::Km$ (Figura 6C).

Para determinar si las mutantes en los genes *sirA*, *csrB* y *csrC* presentan algún defecto en el crecimiento, se hizo una cinética de crecimiento de las cepas WT, $\Delta sirA::Km$, $\Delta csrB::Km$, $\Delta csrC::Km$ y $\Delta csrB \Delta csrC::Km$. Tal como se muestra en la Figura 6D, las cepas crecen de manera similar a la cepa WT. Por tanto, la diferencia en los perfiles proteómicos en las cepas $\Delta sirA::Km$ y $\Delta csrB \Delta csrC::Km$ serán consecuencia de la respectiva mutación y no de un retraso en el crecimiento.

Debido a que las cepas $\Delta sirA::Km$ y $\Delta csrB \Delta csrC::Km$ presentan una mayor reducción de la secreción/expresión de proteínas codificadas en SPI-1, el análisis proteómico se basó en comparar los perfiles proteómicos de las cepas de *S. Typhimurium* WT, $\Delta sirA::Km$ y $\Delta csrB \Delta csrC::Km$, las cuales, en adelante llamaremos simplemente, $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, respectivamente. Por otro lado, en nuestro grupo se determinó que las fusiones transcripcionales de los genes *csrB* y *csrC* al gen reportero *cat*, se expresan a un nivel máximo a las 4.5 h de crecimiento en medio LB, a 37°C (Kuri P., 2010. Tesis de Licenciatura), indicando que los sistemas BarA/SirA y Csr son activos durante la transición de la fase exponencial y estacionaria de crecimiento en LB. Así las condiciones de crecimiento de las cepas que se usaron para el análisis proteómico fueron en medio LB a 37°C después de 4.5 h de crecimiento, es decir, a una OD_{600nm} de 1.4.

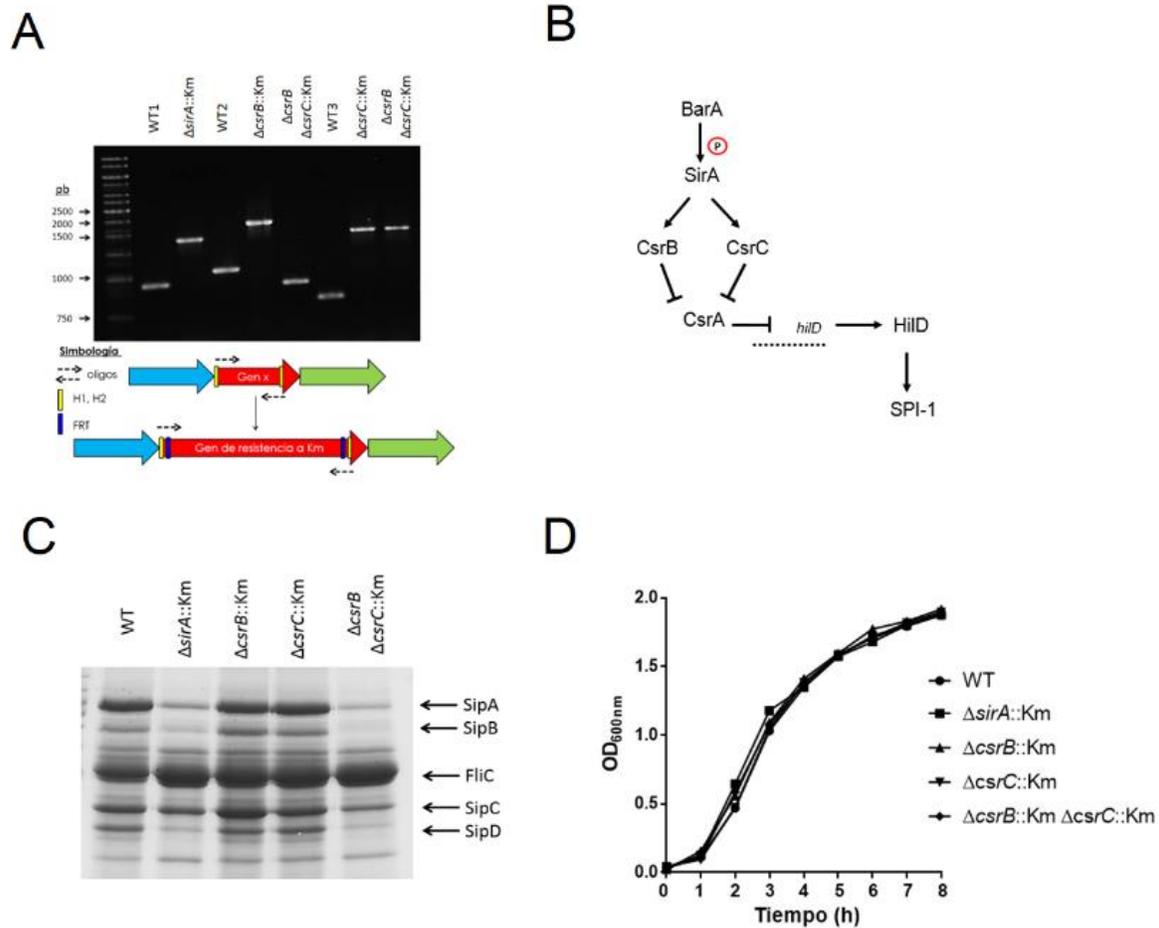


Fig. 6. Caracterización de las cepas de *S. Typhimurium* WT, $\Delta sirA::Km$, $\Delta csrB::Km$, $\Delta csrC::Km$ y $\Delta csrB$ $\Delta csrC::Km$. (A) Caracterización por PCR de la cepa WT de *S. Typhimurium* y sus derivadas mutantes $\Delta sirA::Km$, $\Delta csrB::Km$, $\Delta csrC::Km$ y $\Delta csrB$ $\Delta csrC::Km$. WT1 representa el tamaño del gen *sirA*, WT2 representa el tamaño del gen *csrB*, WT3 representa el tamaño del gen *csrC*. El tamaño del amplicón observado en las mutantes es distinto respecto a la cepa WT correspondiente. En la parte de abajo, se observa el esquema general de mutagénesis (Ver Figura 4). (B) Cascada de regulación de los sistemas BarA/SirA y Csr sobre HilD y los genes de SPI-1. (C) Caracterización del perfil de proteínas secretadas de las cepas del panel A. Los sobrenadantes de cultivos de las distintas cepas de *S. Typhimurium* crecidas en medio LB durante 9 h a 37°C, se tomaron para analizar la secreción de las proteínas SipA, SipB, SipC y SipD, codificadas por SPI-1. FliC es una proteína flagelar cuya secreción es independiente de SPI-1. (D) Cinética de crecimiento de las cepas del panel A, crecidas en medio LB a 37°C. En la gráfica se muestran los datos de OD_{600nm} promedio de dos experimentos diferentes hechos por duplicado.

Análisis proteómico

Para identificar los regulones de los sistemas BarA/SirA y Csr en *S. Typhimurium*, realizamos un análisis global de expresión genética en la cepa WT SL1344 y sus derivadas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB$ $\Delta csrC$ mediante proteómica “label-free” basada en LC-MS/MS. Los resultados de nuestro estudio indican que 1,268 proteínas se expresan entre las cepas WT, $\Delta sirA$ y $\Delta csrB$ $\Delta csrC$ crecidas en medio LB a 37°C a una OD_{600nm} de 1.4 (Figura 7A). La expresión de 164 proteínas se afectó en una o

en ambas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, comparando su expresión con la cepa WT. De estas, la expresión de 74 proteínas se afectó en ambas mutantes; 65 proteínas se afectaron sólo en la mutante $\Delta csrB \Delta csrC$ y 25 proteínas se afectaron sólo en la mutante $\Delta sirA$ (Figura 7B). Que sólo algunas de estas proteínas se afectaran en sólo una de las mutantes y no en ambas, podría indicar que existe un efecto diferencial entre SirA y CsrB/C.

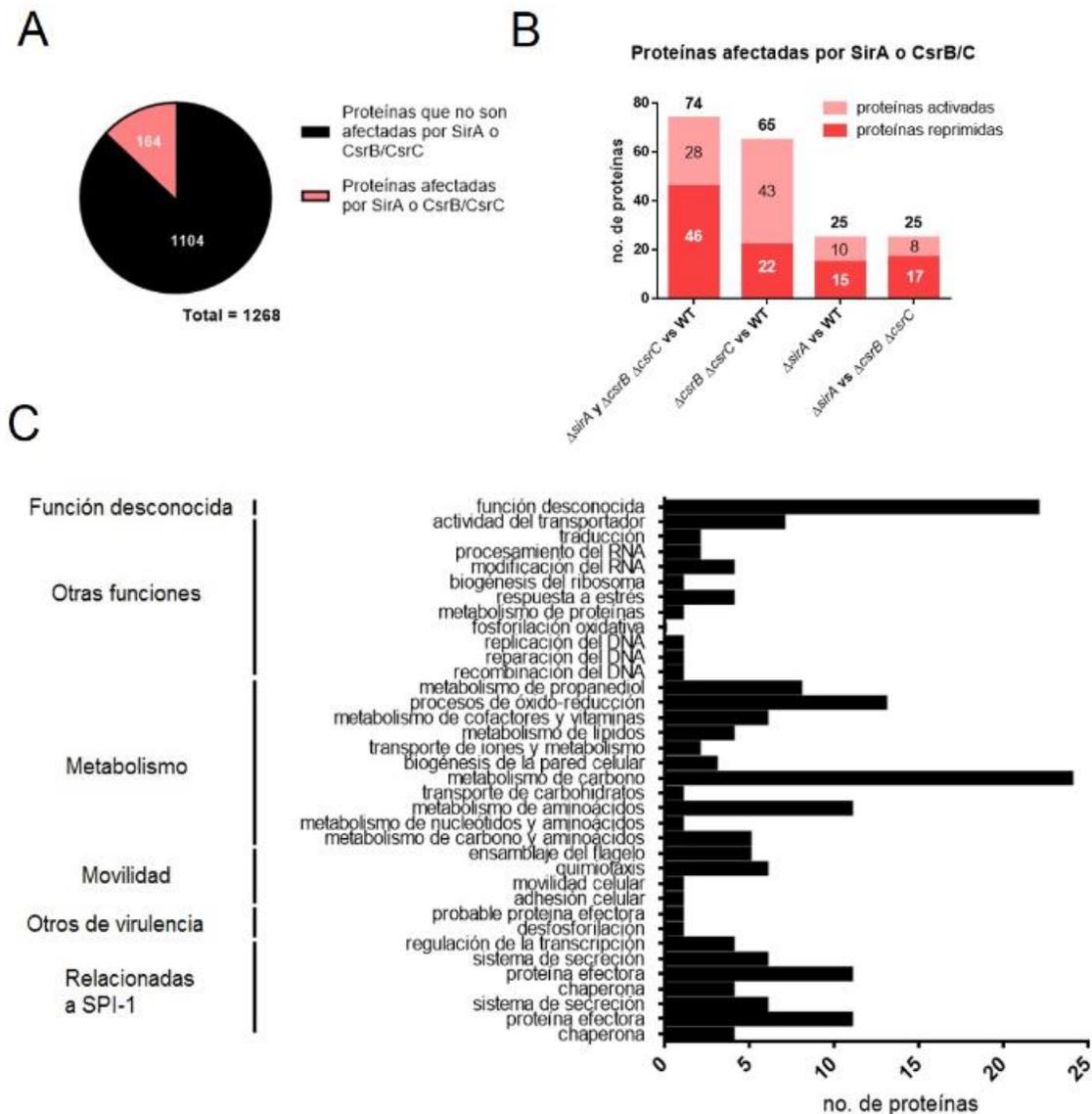


Fig. 7. Clasificación de las proteínas identificadas en el análisis proteómico. (A) Clasificación de las proteínas diferencialmente expresadas en las cepas de *S. Typhimurium* WT, $\Delta csrB \Delta csrC$, y $\Delta sirA$. **(B)** Comparación de las proteínas diferencialmente expresadas en las cepas *S. Typhimurium* del panel A. **(C)** Clasificación de las proteínas reguladas por SirA y CsrB/C en *S. Typhimurium* de acuerdo a su función biológica, usando las bases de datos de NCBI, Uniprot, KEEG y STRING.

Para determinar la probable función de las proteínas cuya expresión se afectó en las cepas $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, se realizó un análisis de su función biológica usando las bases de datos de NCBI, Uniprot, KEEG y STRING. Entre las 164 proteínas cuya expresión cambió en las cepas $\Delta sirA$ y/o $\Delta csrB \Delta csrC$, se encontraron 26 proteínas cuya función está relacionada con SPI-1, otras 2 proteínas de virulencia, 12 a la movilidad, 78 al metabolismo, 24 con otras funciones y 22 a las cuales no se pudo asignar una probable función (Figura 7C).

Entre las proteínas relacionadas con SPI-1 (virulencia) cuya expresión se disminuyó en las dos cepas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, se encuentran varias proteínas codificadas en SPI-1, como las efectoras AvrA, SipA, SipB, SspC y SptP, las chaperonas SicP e InvB, los componentes del SST3-1 InvC, InvJ, OrgAB, PrgH y PrgI-SipD y los reguladores transcripcionales HilC y HilD; además, se encuentran proteínas codificadas en otras SPIs, como SiiE, SopB, SspD y PipC o en otras regiones del genoma, como SopA, SopD, SopE y RtsA (Figura 8 y Anexo 1). Asimismo, se encontraron algunas proteínas cuya expresión sólo se reprimió en una de las cepas mutantes, $\Delta sirA$ o $\Delta csrB \Delta csrC$, como HilA, SpaO y SicA, codificadas en SPI-1, así como PhoN, codificada fuera de SPI-1. Adicionalmente, se encontraron otras 2 proteínas relacionadas a la virulencia en *S. Typhimurium*, como la chaperona fimbrial FimC, cuya expresión se reprimió en ambas mutantes, y la probable proteína efectora SrfB, cuya expresión se activó en una de las cepas mutantes, $\Delta sirA$ o $\Delta csrB \Delta csrC$ (Figura 8 y Anexo 1).

Entre las proteínas relacionadas a la síntesis del flagelo y movilidad cuya expresión incrementó en las dos mutantes, $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, se encuentran FlgN, CheZ, FliT y FlgL (Figura 8 y Anexo 1). Asimismo, se encontraron algunas proteínas cuya expresión sólo se activó en una de las cepas mutantes, $\Delta sirA$ o $\Delta csrB \Delta csrC$, como YcgR, FliG, Aer, SL3126, FlgK, Tsr, CheM y Trg.

Entre las proteínas relacionadas al metabolismo cuya expresión disminuyó en las dos mutantes, $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, se encuentran MurQ, AllC, HisD, CadA, SL1490, GlgC, Udg y YjeF (relacionadas con el metabolismo del carbono y/o aminoácidos), Mpl y YnhG (involucradas en la biogénesis de la pared celular), y YciF y KatN (involucradas en el transporte de iones). Asimismo, entre las proteínas cuya expresión se activó en las dos mutantes, se encuentran SL4396, TdcG, ThrA, HutU, SL4393, TdcE, MalT, AphA, CelF, MelA, YjfQ y SL4470 (relacionadas con el metabolismo del carbono y/o aminoácidos), MglA (involucrada en el transporte de carbohidratos), CbiG (del metabolismo de cofactores y vitaminas), CysQ, SL1071 y AsrB (involucradas en procesos de óxido-reducción), y PduE, PduD, PduP, PduQ y PduS (del metabolismo del propanediol) (Figura 8 y Anexo 1).

Por otra parte, se encuentran proteínas relacionadas al metabolismo cuya expresión se reprimió en sólo una de las cepas mutantes, $\Delta sirA$ o $\Delta csrB \Delta csrC$, como GabD, SL2163, HisF, SL1488, AcnA, YfdZ, OtsB, SLP1_0061, GlgB, LdhA, OtsA, TktB, YibF y TrpA (relacionadas con el metabolismo del carbono y/o aminoácidos), Epd y WrbA (metabolismo de cofactores y vitaminas) y NapA, SL2374, YncB y DkgA (involucradas en procesos de óxido-reducción). Asimismo, se encuentran proteínas cuya expresión se activó en sólo una de las cepas mutantes, $\Delta sirA$ o $\Delta csrB \Delta csrC$, como AstA, DadA, HutH, SL2313, ShdB, GloA y Fucl (relacionadas con el metabolismo del carbono y/o aminoácidos), FadR, LpxA, GlpF y Cfa (del metabolismo de lípidos), HemN, YhhK y CbiC (del metabolismo de cofactores y vitaminas), YdgJ, DmsA, AsrC, DsmB, FdoG y SL2944 (involucradas en procesos de óxido-reducción), DacA (de la biogénesis de la pared celular) y DhaB, PduA y PocR (del metabolismo del propanediol) (Figura 8 y Anexo 1).

Entre las proteínas relacionadas a otras funciones celulares cuya expresión disminuyó en las dos mutantes, $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, se encuentra Ung (reparación del DNA), RpoS (respuesta a estrés), RplW (traducción) y NhaR, SL1423 y YehZ (con actividad de transportadores). Asimismo, entre las proteínas cuya expresión se activó en las dos mutantes, se encuentran Rnc y Tgt (relacionadas a la procesamiento y modificación del RNA) (Figura 8 y Anexo 1).

Por otra parte, entre las proteínas relacionadas a otras funciones celulares cuya expresión se reprimió en sólo una de las cepas mutantes, $\Delta sirA$ o $\Delta csrB \Delta csrC$, se encuentran OsmE, Dps y UspA (relacionadas a la respuesta a estrés), YecO (modificación del RNA) y ArgT (con actividad de transportadores). Asimismo, se encuentran proteínas cuya expresión se activó en sólo una de las cepas mutantes, $\Delta sirA$ o $\Delta csrB \Delta csrC$, se encuentran SogL y Ssb (replicación y recombinación y del DNA), TrmJ, YqcB y RhlB (modificación y procesamiento del RNA), Rpl32 (traducción), ModA, ZnuA y YrbD (con actividad de transportadores), FtsH (procesamiento de proteínas) y YihI (biogénesis del ribosoma) (Figura 8 y Anexo 1).

Entre las proteínas a las cuales no se les encontró una probable función, cuya expresión disminuyó en las dos mutantes, $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, se encuentran SL1780, SL3653, YbaY, YebF y YjbJ. Por otra parte, entre las proteínas cuya expresión se reprimió en sólo una de las cepas mutantes, $\Delta sirA$ o $\Delta csrB \Delta csrC$, se encuentran YdeJ, Ydel, YhcH, YdcJ, YchN, YgiW, ElaA y YdiH. Asimismo, se encuentran proteínas cuya expresión se activó en sólo una de las cepas mutantes, $\Delta sirA$ o $\Delta csrB \Delta csrC$, YgfB, YifE, YcgL, SL1061, YhcB, YegQ, SL1969, SLP2_0011 y YqcC (Figura 8 y Anexo 1).

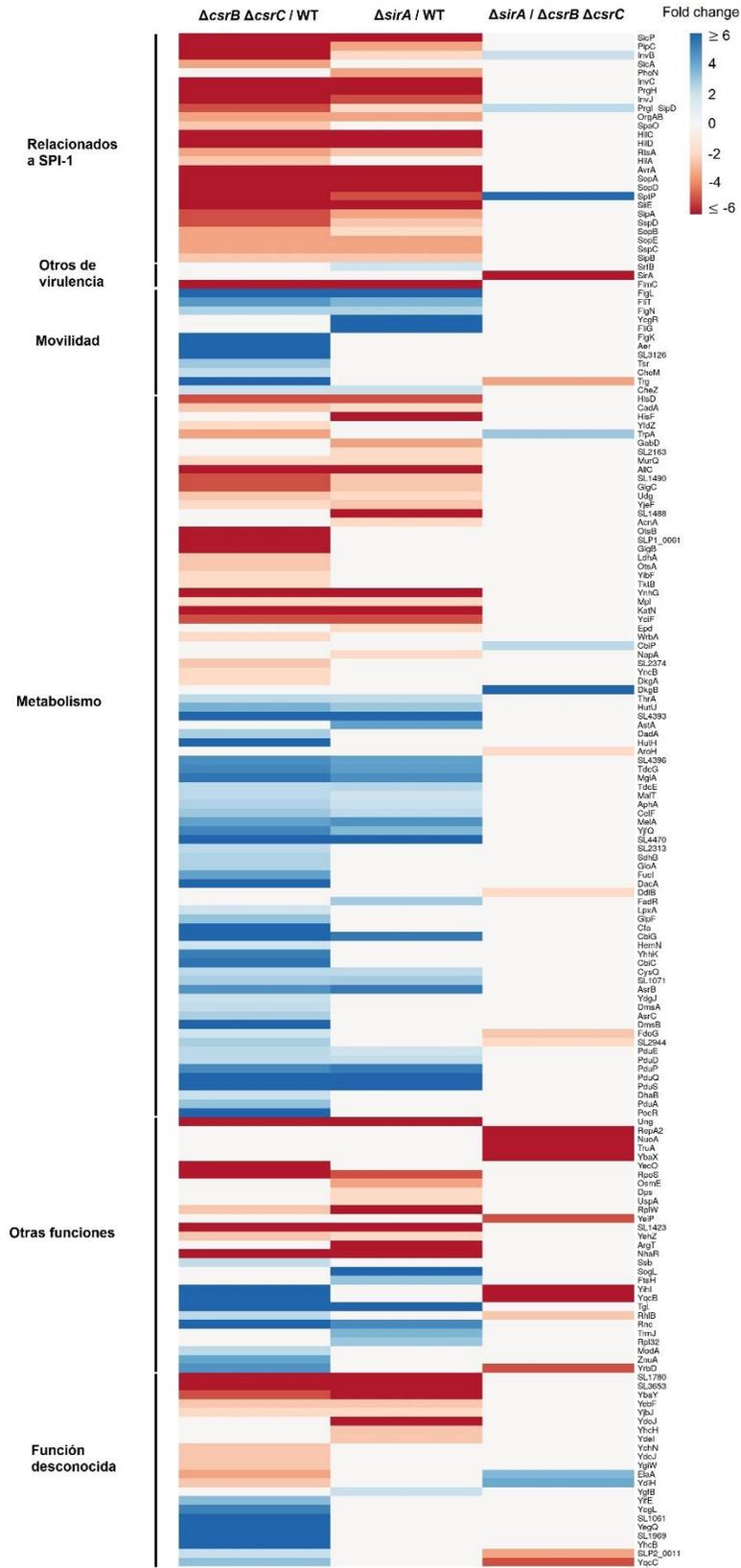


Fig. 8. Clasificación de las proteínas expresadas diferencialmente en las distintas cepas de *S. Typhimurium*. Mapa de calor de las proteínas cuya expresión cambió de manera significativa en las cepas mutantes $\Delta csrB \Delta csrC$ y $\Delta sirA$, con respecto a la cepa WT o en la mutante $\Delta sirA$, con respecto a la mutante $\Delta csrB \Delta csrC$. Se muestra las categorías funcionales de las proteínas relacionadas a SPI-1, otras proteínas de virulencia, involucradas en la movilidad, en el metabolismo, otras funciones y con función desconocida, obtenidas con las bases de datos del NCBI, Uniprot, KEGG y STRING. Esta gráfica fue generada en el servidor web: <https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>.

Dado que la expresión de varias proteínas sólo se afectó en una de las cepas mutantes, $\Delta sirA$ o $\Delta csrB \Delta csrC$, con respecto a la cepa WT, se hizo una comparación directa de las proteínas cuya expresión se afectó en la mutante $\Delta sirA$, con respecto a la mutante $\Delta csrB \Delta csrC$, para evaluar si podría haber un efecto diferencial de BarA/SirA y CsrB/C sobre algunos genes (Figura 7B, 8 y Anexo 1). En total, se identificaron 25 proteínas que cambiaron diferencialmente entre las cepas mutantes, la mayoría de estas se habían identificado previamente en la comparación de las mutantes con la cepa WT. La expresión de 17 proteínas se disminuyó en la mutante $\Delta sirA$, de las cuales se encontró que SirA no se expresó en la cepa $\Delta sirA$, lo que era esperado debido a que esta cepa carece del gen que codifica para esta proteína. De las restantes 16 proteínas, se encuentran Trg (movilidad), SL2944, FdoG, DdIB y AroH (metabolismo de carbono), RhlB, YrbD, YihI, YqcB, YeiP, NuoA, TruA, RepA2 y YbaX (otras funciones celulares) y SLP2_0011 y YqcC (función desconocida) (Figura 7B, 8 y Anexo 1). De manera contraria, la expresión de 8 proteínas se incrementó en la mutante $\Delta sirA$, con respecto a la mutante $\Delta csrB \Delta csrC$, entre estas proteínas se encuentran InvB, PrgI-SipD y SptP (SPI-1), TrpA, DkgB y CbiP (metabolismo de carbono) y ElaA y YdiH (función desconocida) (Figura 7B, 8 y Anexo 1).

Caracterización de las cepas $\Delta sirA$, $\Delta csrB$, $\Delta csrC$ y $\Delta csrB \Delta csrC$

Para poder analizar la expresión de algunos de los genes regulados por los sistemas BarA/SirA y CsrB/C que se identificaron en nuestros ensayos de proteómica mediante fusiones traduccionales o experimentos de Western blot, se requerían cepas mutantes de estos sistemas que no tuvieran el casete de resistencia a Km. En nuestro grupo se contaban con las cepas de *S. Typhimurium* $\Delta sirA$, $\Delta csrB$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, por lo que únicamente le fue removido el casete de Km a la cepa $\Delta csrC::Km$, mediante el método de Datsenko & Wanner (2000). Entonces, se caracterizaron estas mutantes mediante PCR a partir de DNA genómico. En todos los casos, se obtuvo el tamaño esperado del amplicón, donde el tamaño del gen de cada mutante es menor comparado con el de la cepa WT (Figura 9A).

Asimismo, a estas cepas mutantes se les analizó su perfil de proteínas secretadas, para confirmar su fenotipo esperado. La secreción de las proteínas SipA, SipB, SipC y SipD, codificadas en SPI-1, se redujo drásticamente en las cepas mutantes $\Delta sirA$

y $\Delta csrB \Delta csrC$, en comparación con la cepa WT, pero no se afectó significativamente en las cepas mutantes $\Delta csrB$ y $\Delta csrC$ (Figura 9B).

Así, tanto el análisis por PCR como el perfil de proteínas secretadas indicaron que las cepas contenían la mutación esperada.

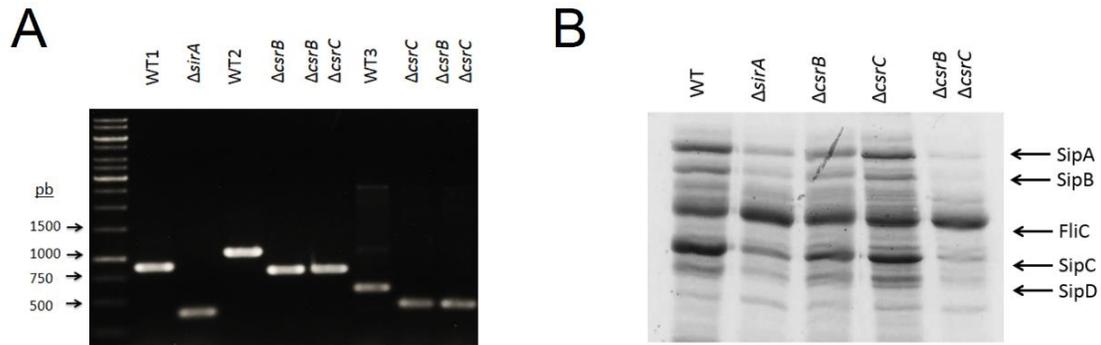


Fig. 9. Caracterización de las cepas de *S. Typhimurium* WT $\Delta sirA$, $\Delta csrB$, $\Delta csrC$ y $\Delta csrB \Delta csrC$. (A) Caracterización por PCR de la cepa WT de *S. Typhimurium* y sus derivadas mutantes $\Delta sirA$, $\Delta csrB$, $\Delta csrC$ y $\Delta csrB \Delta csrC$. WT1 representa el tamaño del gen *sirA*, WT2 representa el tamaño del gen *csrB*, WT3 representa el tamaño del gen *csrC*. El tamaño del amplicón observado en las mutantes es menor respecto a la cepa WT correspondiente. (B) Caracterización del perfil de proteínas secretadas de las cepas descritas en el panel A. Los sobrenadantes de cultivos de las distintas cepas de *S. Typhimurium* crecidas en medio LB durante 9 h a 37°C, se usaron para analizar la secreción de las proteínas SipA, SipB, SipC y SipD, codificadas por SPI-1. FliC es una proteína flagelar cuya secreción es independiente de SPI-1.

Confirmación de la regulación por SirA y/o Csr de los genes *ydcJ*, *yebF* y *yqcC* mediante fusiones traduccionales a *lacZ*

Para validar nuestros resultados de proteómica, se seleccionaron algunos de los genes que mostraron regulación por SirA y/o CsrB/C, para analizar ahora su expresión mediante fusiones traduccionales al gen reportero *lacZ*. En primera instancia, nos enfocamos a los genes que codifican para proteínas de función desconocida o putativa, como YdcJ (proteína de función desconocida), YebF (proteína de función desconocida que se secreta) y SL2374 (azúcar isomerasa putativa), las cuales mostraron una disminución de su expresión en una o en ambas cepas $\Delta csrB \Delta csrC$ y/o $\Delta sirA$, con respecto a la cepa WT; así como para las proteínas SLP2_0011 (proteína de plásmido con función desconocida), CbiP (sintasa de ácido cobálico putativa) y YqcC (proteína de función desconocida), las cuales mostraron una expresión diferente entre las cepas $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$ (Figura 10).

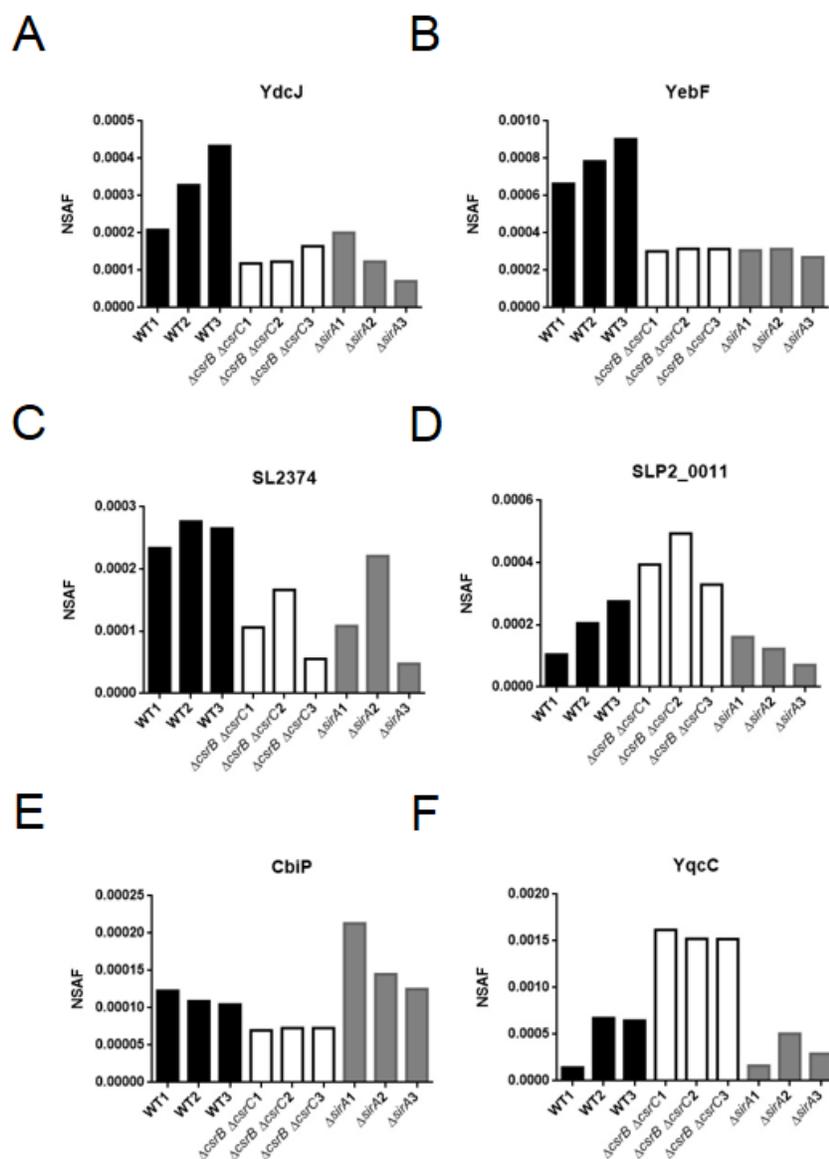


Fig. 10. Cuantificación relativa de la expresión de YdcJ, YebF, SL2374, SLP2_0011, CbiP y YqcC. Factor de abundancia espectral normalizado (NSAF) de la expresión de YdcJ (A), YebF (B), SL2374 (C) SLP2_0011 (D), CbiP (E), y YqcC (F), a partir de los datos proteómicos obtenidos por LC-MS/MS en las cepas de *S. Typhimurium* WT, $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$. En la gráfica se muestran los valores de las tres réplicas de cada cepa.

La expresión de YdcJ disminuyó 2.5 veces en las cepas mutantes $\Delta csrB \Delta csrC$ y $\Delta sirA$, comparada con su expresión en la cepa WT; sin embargo, la diferencia en la expresión en la cepa mutante $\Delta sirA$ con respecto a la WT tiene un valor de $p > 0.05$ (*t de Student*) (Figura 10A y Anexo 1). YdcJ es una proteína de función desconocida, su secuencia tiene 87% de identidad con la de *E. coli* K-12 y 93% con la de *S. bongori*; además, el gen que codifica para esta proteína tiene un contexto genómico similar en *S. Typhimurium*, *S. bongori* y *E. coli* K-12 (Figura 11A). La expresión de YebF disminuyó 2.5 veces en las cepas mutantes $\Delta csrB \Delta csrC$ y $\Delta sirA$, comparada

con su expresión en la cepa WT (Figura 10 y Anexo 1). YebF es una proteína de función desconocida que se secreta, su secuencia tiene 76% de identidad con la de *E. coli* K-12 y 92% con la de *S. bongori*; además, el gen que codifica para esta proteína tiene un contexto genómico similar en *S. Typhimurium*, *S. bongori* y *E. coli* K-12 (Figura 11B). La expresión de SL2374 disminuyó 2.5 y 2 veces en las cepas mutantes $\Delta csrB \Delta csrC$ y $\Delta sirA$, respectivamente, comparada con su expresión en la cepa WT; sin embargo, la diferencia en la expresión en la cepa mutante $\Delta sirA$ con respecto a la WT tiene un valor de $p > 0.05$ (*t* de *Student*) (Figura 10C y Anexo 1). SL2374 es una proteína de canal iónico putativo que contiene una identidad del 95% con *S. bongori*, y no está codificada en el genoma de *E. coli* (Figura 11C).

Por otra parte, la expresión de SLP2_0011 disminuyó 3.3 veces en la cepa $\Delta sirA$, con respecto a la cepa $\Delta csrB \Delta csrC$ y 1.6 veces con respecto a la WT (Figura 10D y Anexo 1). SLP2_0011 es una proteína de función desconocida codificada en el plásmido pCol1B9; además, el gen que codifica para esta proteína no está presente en *S. bongori* ni en *E. coli* K-12 (Figura 11D). La expresión de CbiP aumentó 2.3 veces en la cepa $\Delta sirA$, con respecto a la cepa $\Delta csrB \Delta csrC$ y 1.4 veces con respecto a la WT (Figura 10E y Anexo 1). CbiP es una sintasa de ácido cobálico putativa, está codificada en el operón *cbiABCDEFGHIJKLMNQOPcobUST* de la síntesis de vitamina B₁₂; sin embargo, este operón no está presente en *S. bongori* ni en *E. coli* K-12 (Figura 11E). La expresión de YqcC disminuyó 5 veces en la cepa $\Delta sirA$, con respecto a la cepa $\Delta csrB \Delta csrC$ y 1.42 veces con respecto a la WT (Figura 10F y Anexo 1). YqcC es una proteína de función desconocida codificada en el operón *yqcCBA*; YqcB es una RNA pseudouridilato sintasa que modifica a los tRNAs, mientras que YqcA es una flavodoxina putativa. El contexto genómico del operón *yqcCBA* es similar en *S. bongori* y en *E. coli* K-12 (Figura 11F).

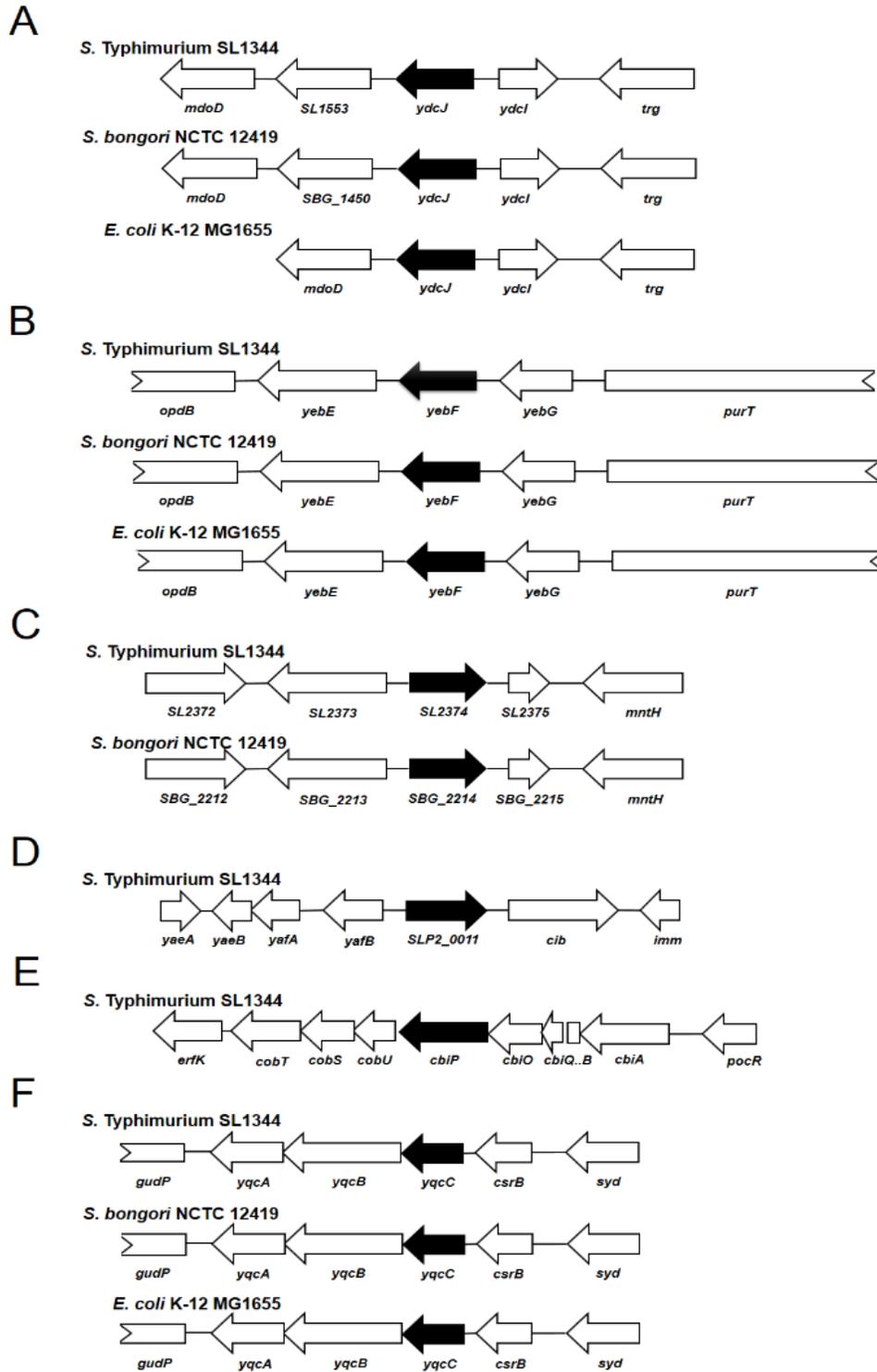


Fig. 11. Contexto genómico de *ydcJ*, *yebF*, *SLP2_0011*, *SL2374*, *cbpP* y *yqcC*. Contexto genómico de *ydcJ* (A), *yebF* (B), *SL2374* (C), *SLP2_0011* (D), *cbpP* (E), y *yqcC* (F) en *S. Typhimurium* SL1344, *S. bongori* NCTC 12419 y *E. coli* K-12 MG1655. En algunos casos los genes no están presentes en *E. coli* o *S. bongori*, por lo que no se muestran los contextos genómicos en estas bacterias.

Así, se construyeron fusiones traduccionales de los genes *ycdJ*, *yebF*, *SL2374*, *SLP2_0011*, *cbiP* y *yqcC* al gen reportero *lacZ*, en el vector pRS414. En todos los casos, para la construcción de estas fusiones se usaron fragmentos de DNA que abarcan la región intergénica localizada corriente arriba de cada gen o, para el caso de *cbiP*, del primer gen del operón, la cual incluyó los primeros 10 codones del respectivo gen estructural. La expresión de estas fusiones se analizó en la cepa WT de *S. Typhimurium* y en sus derivadas mutantes, $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, crecidas en medio LB a 37°C hasta una OD_{600nm} de 1.4. La expresión de las fusiones *ycdJ-lacZ* y *yebF-lacZ* disminuyó significativamente en las mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, con respecto a la cepa WT (Figura 12A y B), mientras que la expresión de *yqcC-lacZ* aumentó significativamente en la cepa mutante $\Delta csrB \Delta csrC$, pero no en la cepa mutante $\Delta sirA$ (Figura 12F). Estos resultados apoyan la regulación positiva por SirA y CsrB/C de los genes *ycdJ* y *yebF*, así como a regulación negativa por CsrB/C del gen *yqcC*, revelada por el análisis proteómico.

Para confirmar los resultados anteriores, se analizó la expresión de las fusiones *ycdJ-lacZ*, *yebF-lacZ* y *yqcC-lacZ* en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344, conteniendo o no el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-CsrA que expresa constitutivamente a CsrA. La expresión de *ycdJ-lacZ* y *yebF-lacZ* disminuyó, y la de *yqcC-lacZ* aumentó, cuando se sobre-expresa CsrA (Figura 13). Para determinar si el incremento en la expresión del gen *yqcC* en la cepa $\Delta csrB \Delta csrC$, con respecto a la cepa WT o a la mutante $\Delta sirA$ (Figura 12F y 13C), se debe a una mayor concentración de CsrA libre en la cepa mutante $\Delta csrB \Delta csrC$, la expresión de la fusión *yqcC-lacZ* también se analizó en la cepa mutante $\Delta csrB \Delta csrC$ conteniendo el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-CsrB que expresa constitutivamente a CsrB. La expresión de CsrB disminuiría el nivel de CsrA libre. La expresión de CsrB disminuyó la expresión de la fusión *yqcC-lacZ* en la cepa mutante $\Delta csrB \Delta csrC$ (Figura 13C). En conjunto, estos resultados indican que CsrA regula negativamente la expresión de los genes *ycdJ* y *yebF*, y positivamente la expresión del gen *yqcC*, lo cual es consistente con los resultados descritos arriba mostrando la regulación positiva por SirA y CsrB/C de los genes *ycdJ* y *yebF*, y la regulación negativa por CsrB/C del gen *yqcC*.

Por otro lado, la expresión de las fusiones *SL2374-lacZ*, *SLP2_0011-lacZ* y *cbi-lacZ* fue similar en la cepa WT y en sus derivadas mutantes, $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$ (Figura 12C, D y E). Estos resultados contrastan con los obtenidos en el análisis proteómico, donde se observó regulación de estos genes por SirA y/o CsrB/C. Esta discrepancia podría explicarse por una falta de todos los elementos de regulación en los fragmentos de DNA utilizados para la construcción de las fusiones de estos genes. Alternativamente, los valores obtenidos en la proteómica para estos genes podrían tener variaciones propias de la metodología.

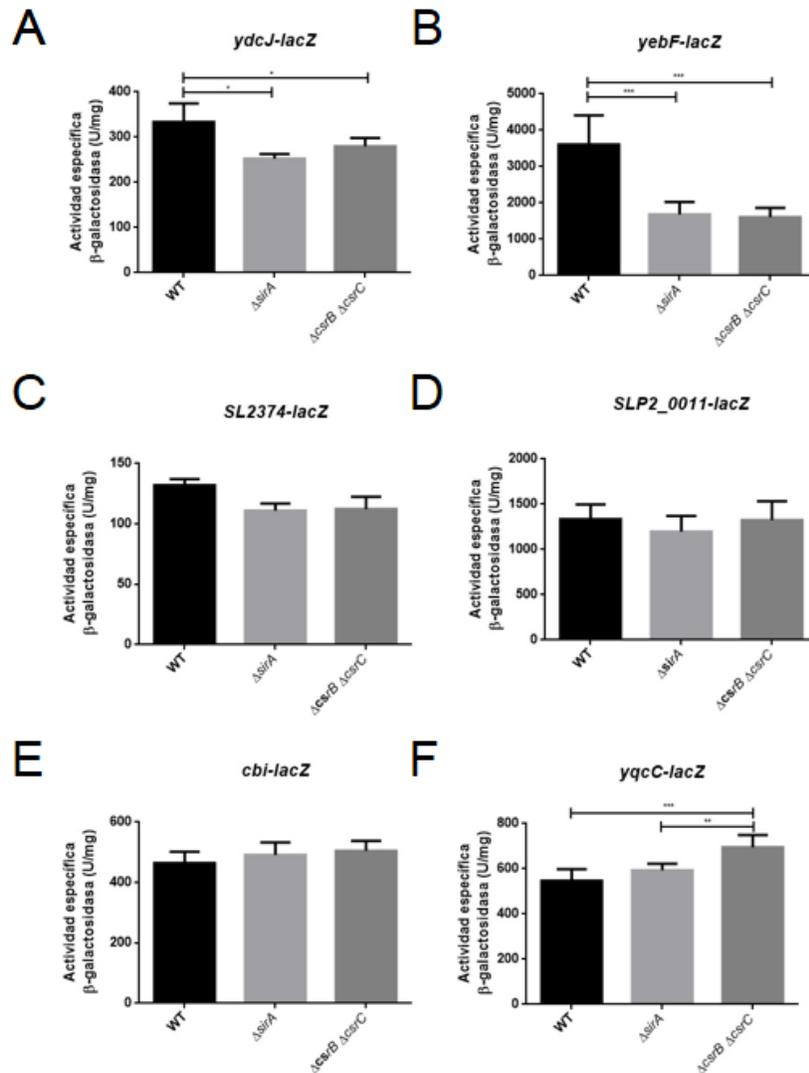


Fig. 12. La expresión de YdcJ, YebF y YqcC, pero no de SL2374, SLP2_0011 y CbiP, es regulada por SirA y/o CsrB/C. La expresión de las fusiones traduccionales *ydcJ-lacZ* (A), *yebF-lacZ* (B), *SL2374-lacZ* (C), *SLP2_0011-lacZ* (D), *cbi-lacZ* (E), y *yqcC-lacZ* (F), contenidas en los plásmidos *pydcJ-lacZ*, *pyebF-lacZ*, *pSL2374-lacZ*, *pSLP2_0011-lacZ*, *pcbi-lacZ* y *pyqcC-lacZ*, respectivamente, fue determinada en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y en sus derivadas mutantes, $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$. La actividad específica β-galactosidasa se determinó a partir de muestras de cultivos crecidos en medio LB hasta una OD_{600nm} de 1.4 (aproximadamente 4.5 h) a 37°C. Los datos graficados representan los promedios y la desviación estándar de los resultados obtenidos a partir de tres experimentos independientes hechos por duplicado. *, ** y ***, valores con diferencia significativa entre las cepas indicadas; $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$, y $p \leq 0.0001$, respectivamente.

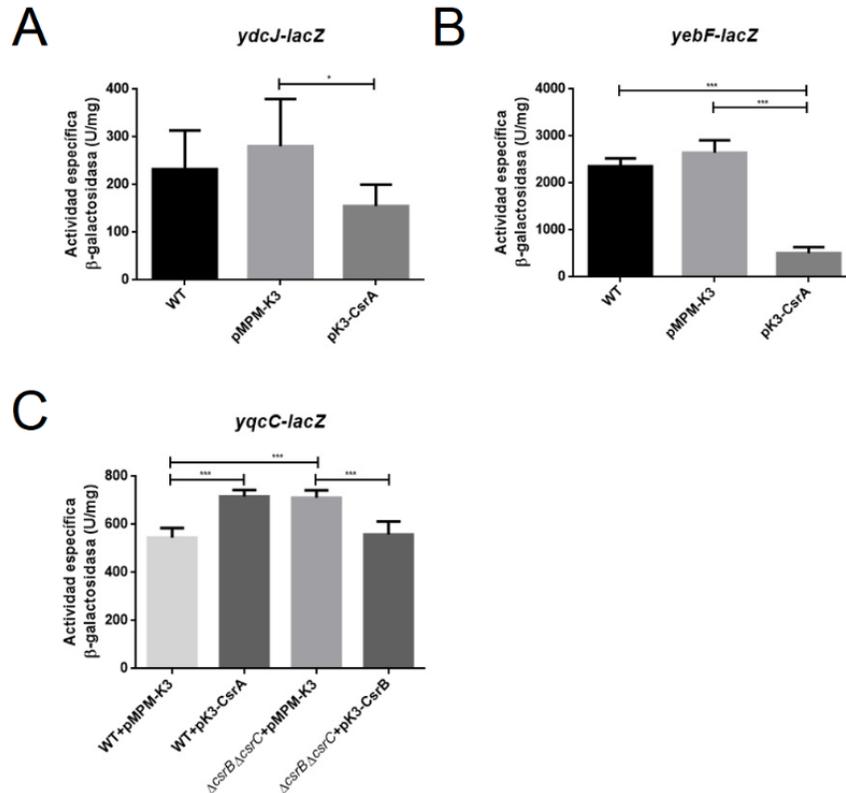


Fig. 13. La expresión de YdcJ, YebF y YqcC es regulada por CsrA. La expresión de las fusiones traduccionales *ydcJ-lacZ* (A), *yebF-lacZ* (B) y *yqcC-lacZ* (C), contenidas en los plásmidos pydcJ-lacZ, pyebF-lacZ y pyqcC-lacZ, respectivamente, fue determinada en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 conteniendo o no el vector pMPM-K3, o el plásmido pK3-CsrA que expresa CsrA a partir de un promotor constitutivo; para el caso de *yqcC-lacZ*, también en la cepa $\Delta csrB \Delta csrC$ conteniendo el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-CsrB que expresa CsrB a partir de un promotor constitutivo. La actividad específica β -galactosidasa se determinó a partir de muestras de cultivos crecidos en medio LB hasta una OD_{600nm} de 1.4 (aproximadamente 4.5 h) a 37°C. Los datos graficados representan los promedios y la desviación estándar de los resultados obtenidos de tres experimentos independientes hechos por duplicado. * y ***, valores con diferencia significativa entre las cepas indicadas; $p \leq 0.01$ y $p \leq 0.0001$, respectivamente.

Confirmación de la regulación por SirA y Csr del gen *yebF* mediante ensayos de Western blot

Para confirmar la regulación de *yebF* por SirA y Csr con otra metodología, se construyó la cepa de *S. Typhimurium* *yebF::3XFLAG-km*, la cual expresa a YebF etiquetada con el epítipo 3X-FLAG (YebF-FLAG). Posteriormente, se transfirió, mediante transducción con el fago P22, el alelo *yebF::3XFLAG-km* a las cepas $\Delta sirA$, $\Delta csrB$, $\Delta csrC$ y $\Delta csrB \Delta csrC$. La expresión de YebF-FLAG se analizó en todos en estos fondos genéticos, así como en la cepa WT conteniendo el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-CsrA que expresa constitutivamente a CsrA. En las cepas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$ se observó una disminución en la expresión de YebF-FLAG, con respecto a la cepa WT y a las cepas mutantes $\Delta csrB$ y $\Delta csrC$ (Figura 14). Asimismo, la expresión de CsrA, a partir del plásmido pK3-CsrA,

reprimió por completo la expresión de YebF-FLAG en la cepa WT (Figura 14). Cabe hacer notar que la disminución de la expresión de YebF-FLAG fue mayor en la mutante $\Delta csrB \Delta csrC$ que en la mutante $\Delta sirA$, lo cual sugiere que se tiene una mayor cantidad de CsrA libre en ausencia de CsrB/C que en ausencia de SirA, tal vez debido a una expresión basal de *csrB/C* en ausencia de SirA.

En conjunto, estos resultados confirman que la expresión YebF es controlada positivamente por SirA y CsrB/C, y negativamente por CsrA.

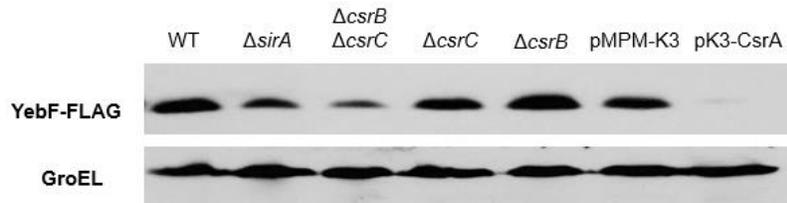


Fig. 14. Los sistemas BarA/SirA y Csr regulan la expresión de YebF. La expresión YebF-FLAG en la cepa WT de *S. Typhimurium* y en sus derivadas mutantes $\Delta sirA$, $\Delta csrB \Delta csrC$, $\Delta csrB$ y $\Delta csrC$, así como la cepa WT que contiene el vector pMPPM-K3 o el plásmido pK3-CsrA que expresa a CsrA a partir de un promotor constitutivo, fue analizada por Western blot usando el anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Las muestras se tomaron a partir de cultivos crecidos en LB durante toda la noche a 37°C. Como control de carga, se analizó la expresión de GroEL, usando el anticuerpo policlonal anti-GroEL.

La proteína YebF se secreta en *S. Typhimurium*

En *E. coli* se ha demostrado que YebF se secreta por la vía Sec (Zhang *et al.*, 2006). Para determinar si YebF se secreta también en *S. Typhimurium*, se analizó, mediante Western blot, la presencia de YebF-FLAG en los sobrenadantes de cultivos de la cepa WT crecida en medio LB durante 9 h. Como control positivo de secreción, se analizó a la proteína SL1770-FLAG, la cual ha sido estudiada en nuestro grupo (Banda *et al.*, datos no publicados). Como control negativo de secreción, se analizó a la proteína citoplasmática GroEL. Las proteínas YebF-FLAG y SL1770-FLAG fueron detectadas tanto en el extracto total de las bacterias como en el sobrenadante de los cultivos, en contraste, la proteína GroEL se detectó únicamente en el extracto total de las bacterias (Figura 15). Estos resultados muestran que YebF se secreta en *S. Typhimurium*.

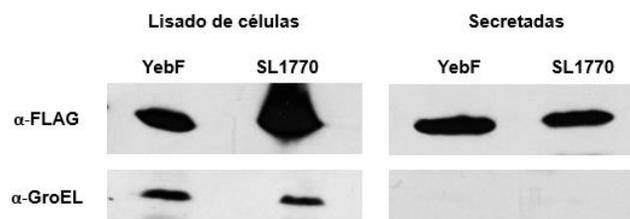


Fig. 15. La proteína YebF se secreta en *S. Typhimurium*. La expresión YebF-FLAG en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344, a partir de extractos celulares totales o de proteínas presentes en los sobrenadantes de los cultivos, fue analizada por Western blot usando el anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Las muestras para los extractos celulares totales y de los sobrenadantes se tomaron a partir de cultivos bacterianos crecidos a 37°C durante 9 h. Como controles positivo y negativo de la secreción se analizó la presencia de las proteínas SL1770-FLAG y GroEL, respectivamente.

YebF no está involucrado en la movilidad de *S. Typhimurium*

Ya que los sistemas BarA/SirA y Csr regulan la expresión de las proteínas necesarias para la producción del flagelo y para la quimiotaxis, investigamos si YebF está involucrada en la movilidad de *S. Typhimurium*. Para esto, se analizó la movilidad de la cepa WT de *S. Typhimurium* y de la mutante $\Delta yebF$ en placas de LB con un bajo contenido de agar (al 0.3%); la movilidad se observa como halos de difusión radial alrededor del inoculo inicial. Como un control negativo de movilidad, se analizó también la cepa mutante $\Delta flhDC$, en la cual no se expresan los genes flagelares y de quimiotaxis. La cepa WT y la mutante $\Delta yebF$ presentaron un fenotipo de movilidad similar, como era esperado, la cepa mutante $\Delta flhDC$ no presentó movilidad. Estos resultados indican que YebF no se requiere para la movilidad de *S. Typhimurium* (Figura 16).

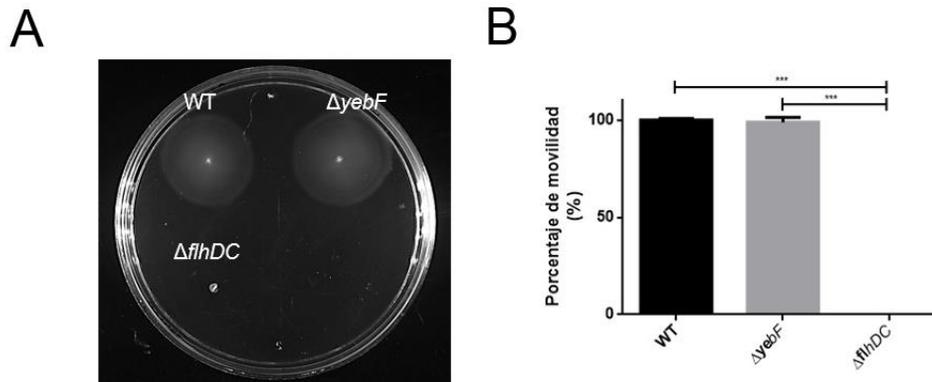


Fig. 16. La ausencia de *yebF* no afecta la movilidad de *S. Typhimurium*. Visualización (A) y porcentaje de movilidad (B) de la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y sus derivadas mutantes $\Delta yebF$ y $\Delta flhDC$, obtenida en placas de LB con agar suave después de 6 h de incubación a 37°C. El porcentaje de movilidad se determinó midiendo los diámetros de los halos de movilidad de cada cepa y tomando los valores de la cepa WT como el 100%. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de los resultados obtenidos a partir tres experimentos hechos por quintuplicado. ***, valores con diferencia significativa entre las cepas indicadas; $p \leq 0.0001$.

YebF no está involucrado en la invasión o replicación intracelular de *S. Typhimurium* en células HeLa

Los sistemas BarA/SirA y Csr regulan la expresión de un gran número de proteínas necesarias para la invasión de *Salmonella* a sus células hospederas. Con base en esto, investigamos si YebF se requiere para la invasión de *S. Typhimurium* a células

HeLa, mediante el ensayo de protección por gentamicina. Para esto, monocapas de células HeLa fueron infectadas con la cepa WT de *S. Typhimurium* y con la mutante $\Delta yebF$ y se determinó el número de bacterias intracelulares a 1 h después de la infección. Como control positivo de un defecto en la invasión se analizó también la mutante $\Delta hilD$, la cual no expresa a los genes de SPI-1, necesarios para la invasión de *Salmonella* a sus células hospederas. La cepa WT y la mutante $\Delta yebF$ mostraron un fenotipo de invasión similar; en contraste, la mutante $\Delta hilD$ no fue capaz de invadir a las células HeLa (Figura 17A). También investigamos si YebF se requiere para la replicación intracelular de *S. Typhimurium* en células HeLa. Para esto, se determinó el número de bacterias intracelulares a las 8 y 16 h después de la infección con la cepa WT o con la cepa mutante $\Delta yebF$. Como control positivo de un defecto en la replicación intracelular, se analizó también la mutante $\Delta ssrB$, la cual no expresa a los genes de SPI-2, importantes para la replicación de *Salmonella* dentro de sus células hospederas. La cepa WT y la mutante $\Delta yebF$ mostraron un fenotipo de replicación intracelular similar; como era esperado, la mutante $\Delta ssrB$ mostró un fenotipo de replicación disminuido (Figura 17B y C). En conjunto, estos resultados indican que YebF no está involucrada en los fenotipos de invasión o replicación intracelular de *S. Typhimurium* en células HeLa.

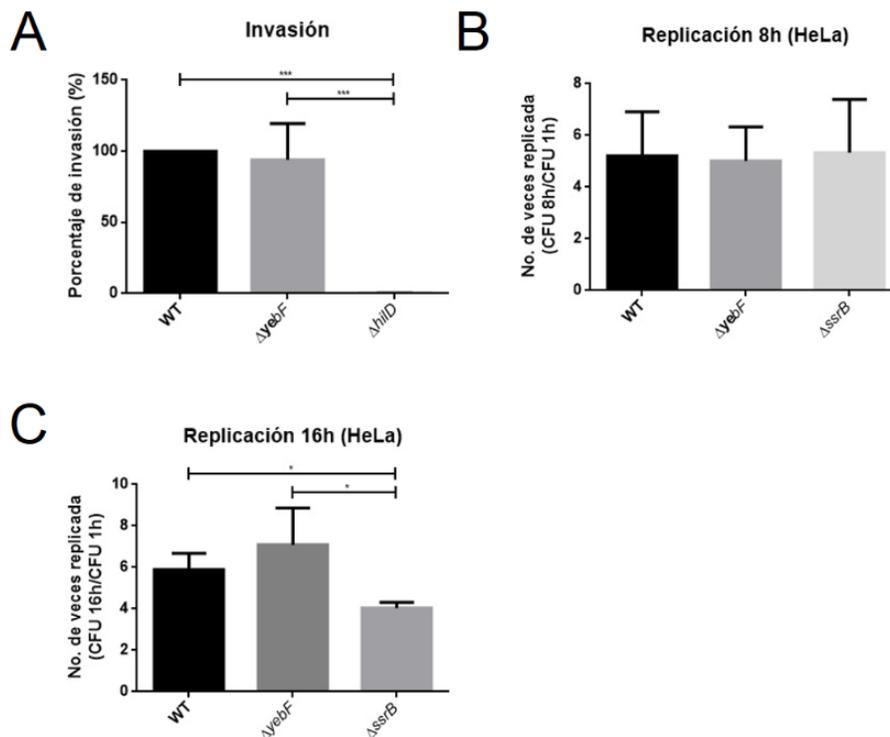


Fig. 17. YebF no está involucrada en los fenotipos de invasión o replicación intracelular de *S. Typhimurium* en células HeLa. Monocapas de células HeLa fueron infectadas con la cepa WT de *S. Typhimurium* WT o con las cepas mutantes $\Delta yebF$, $\Delta hilD$ o $\Delta ssrB$. El número de bacterias intracelulares se obtuvo a 1 (A), 8 (B) y 16 (C) h después de la infección. El porcentaje de invasión se obtuvo tomando como 100% el número de bacterias intracelulares de la cepa WT, a 1 h después de la infección. El número de veces en la replicación se obtuvo al dividir el número de bacterias intracelulares obtenidas a las 8 o 16 h después de la infección entre el número de bacterias intracelulares obtenidas a 1 h después de la infección, para cada cepa. Los datos representan el promedio y desviación estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes. * y ***, valores con diferencia significativa entre las cepas indicadas; $p \leq 0.01$ y $p \leq 0.0001$, respectivamente.

La expresión de HilE es regulada por SirA y Csr

Resultados preliminares de nuestro grupo sugieren que la sobre-expresión de CsrA disminuye la expresión de la proteína HilE-FLAG en *S. Typhimurium* (Bustamante *et al.*, datos no publicados). HilE es una proteína que interacciona e inactiva al regulador HilD y por lo tanto afecta negativamente la expresión de los genes de SPI-1 (Baxter *et al.*, 2003). Con base en este antecedente nos planteamos investigar si los sistemas BarA/SirA y Csr controlan la expresión de HilE. Para esto, primero se analizó la expresión de HilE-FLAG y de la fusión *hilE-lacZ* en la cepa WT de *S. Typhimurium* conteniendo o no el vector pMPM-K3 o el plásmido pK3-CsrA, el cual expresa constitutivamente a CsrA. Consistente con lo observado previamente, la sobre-expresión de CsrA, a partir del plásmido pK3-CsrA, reprimió la expresión de HilE-FLAG y de la fusión *hilE-lacZ* (Figura 18A y B). Posteriormente se analizó la expresión de HilE-FLAG y de la fusión *hilE-lacZ* en la cepa WT de *S. Typhimurium* y sus derivadas mutantes $\Delta sirA$, $\Delta csrB$, $\Delta csrC$ y $\Delta csrB \Delta csrC$. La expresión de HilE-FLAG y de la fusión *hilE-lacZ* se disminuyó significativamente en las mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, pero no en las mutantes $\Delta csrB$ y $\Delta csrC$, con respecto a la cepa WT (Figura 18C y D). En conjunto, estos resultados muestran que SirA y CsrB/C regulan positivamente la expresión de HilE, mientras que CsrA lo hace negativamente.

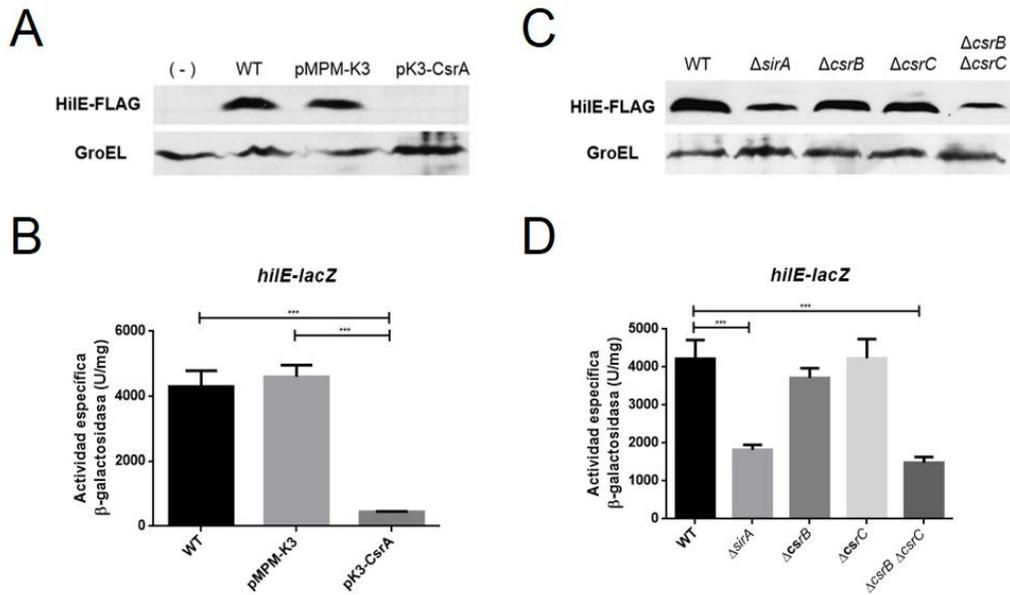


Fig. 18. Los sistemas BarA/SirA y Csr regulan la expresión de HiiE. La expresión de HiiE-FLAG se monitoreó mediante Western blot en la cepa de *S. Typhimurium* *hiiE::3XFLAG-km*, en presencia o no del vector pMPPM-K3 o del plásmido pK3-CsrA que expresa constitutivamente a CsrA (A), así como en la cepas WT y sus derivadas mutantes $\Delta sirA$, $\Delta csrB$, $\Delta csrC$ y $\Delta csrB \Delta csrC$ que contienen el alelo *hiiE::3XFLAG-km* (C), usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. La cepa WT de *S. Typhimurium* que no contiene el alelo *hiiE::3XFLAG-km* fue también analizada como un control negativo (A). Las muestras para la detección de HiiE-FLAG se tomaron a partir de cultivos crecidos en medio LB durante toda la noche a 37°C. Como control de carga, se analizó la expresión de GroEL usando el anticuerpo policlonal anti-GroEL. La expresión de la fusión *hiiE-lacZ*, contenida en el plásmido *hiiE-lacZ*, se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium*, en presencia o no del vector pMPPM-K3 o del plásmido pK3-CsrA que expresa constitutivamente CsrA (B), o en la cepa WT y sus derivadas mutantes $\Delta sirA$, $\Delta csrB$, $\Delta csrC$ y $\Delta csrB \Delta csrC$ (D). La actividad específica de la enzima β-galactosidasa se determinó a partir de muestras de cultivos crecidos en medio LB hasta una OD_{600nm} de 1.4 (aproximadamente 4.5 h) a 37°C. Los datos graficados representan el promedio y la desviación estándar de los resultados obtenidos de tres experimentos independientes hechos por duplicado. ***, valores con diferencia significativa entre las cepas indicadas; $p \leq 0.0001$.

DISCUSIÓN

En este estudio realizamos un análisis proteómico mediante LC-MS/MS, para definir el regulón de los sistemas BarA/SirA y Csr de *S. Typhimurium*, en condiciones de crecimiento que favorecen la expresión de los genes de SPI-1, necesarios para la invasión de *Salmonella* a células hospederas. Se identificó la expresión de 1,187 proteínas en la cepa WT, lo cual define el proteoma de *S. Typhimurium* en las condiciones probadas, esto representa el 25% del total de proteínas codificadas en el genoma y plásmidos de *S. Typhimurium* SL1344. La expresión de varias proteínas sólo se detectó en una o ambas cepas mutantes analizadas ($\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$); así, en total se detectó la expresión de 1,268 proteínas en las cepas probadas (Figura 7).

La expresión de 164 proteínas se afectó de manera significativa en la ausencia de los reguladores SirA y/o CsrB/C; estas proteínas comprenderían el regulón de SirA y/o CsrB/C. De acuerdo a nuestro análisis computacional, la mayoría de estas 164 proteínas están relacionadas a diferentes funciones celulares, como virulencia, movilidad, metabolismo y respuesta a diferentes tipos de estrés; a varias no se les encontró una probable función (Figura 7 y Anexo 1).

Previamente, en nuestro grupo se encontró que SirA y CsrB/C inducen la expresión de los genes de SPI-1, contrarrestando la represión que ejerce directamente CsrA sobre la traducción del gen *hiiD*, el cual codifica para el regulador positivo central de los genes de SPI-1 (Martínez *et al.*, 2011). Consistente con esto, nuestro análisis proteómico reveló una regulación positiva por SirA y/o CsrB/C de muchos genes localizados en SPI-1 (AvrA, SipA, SipB, SspC, SptP, SicP, InvB, InvC, InvJ, OrgAB, PrgH, PrgI-SipD, HilC y HilD), así como de varios otros genes localizados fuera de SPI-1, pero que su expresión también se controla por HilD (SiiE, SopB, SspD, PipC, SopA, SopD, SopE y RtsA, HilA, SpaO, SicA y PhoN) (Figura 8 y Anexo 1). Así, como podría esperarse, la regulación de *hiiD* por los sistemas BarA/SirA y Csr impacta a los diferentes miembros del regulón de HilD.

Adicionalmente, se clasificaron otras 2 proteínas de virulencia, FimC y SrfB (Figura 7, 8 y Anexo 1). FimC es una chaperona fimbrial codificada en el operón *fimAICDHF*, la cual facilita la producción de la fimbria tipo I necesaria para la adhesión de *S. Typhimurium* a las células hospederas en las primeras etapas de invasión (Fàbrega & Vila, 2013). La expresión de FimC se encuentra reprimida en las cepas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, consistente con la represión de los genes relacionados a SPI-1 en estas mismas cepas. Por otra parte, SrfB es una probable proteína efectora cuya expresión está activada en las cepas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$ (Figura 8 y Anexo 1). Aunque no se conoce la función de esta proteína, se ha descrito que es regulada positivamente por FlhDC (Frye *et al.*, 2006), por lo que podría ser parte del

regulón de FlhDC que se reprime por SirA y CsrB/C, consistente con los resultados obtenidos de SrfB en nuestros datos proteómicos.

En nuestro análisis proteómico, se identificaron en total 26 proteínas relacionadas a SPI-1, como reguladas por SirA y/o CsrB/C (Anexo 1). En estudios previos se habían identificado todas estas proteínas, como reguladas por SirA y/o Csr en *Salmonella* (Lawhon *et al.*, 2003; Kulkarni *et al.*, 2014; Zere *et al.*, 2015; Holmqvist *et al.*, 2016; Colgan *et al.*, 2016). Por otra parte, se identificaron otras 2 proteínas relacionadas con virulencia, de estas sólo FimC se había descrito como regulada por Csr en *E. coli* K-12 (Sowa *et al.*, 2017; Esquerré *et al.*, 2016; Kulkarni *et al.*, 2014), mientras que SrfB no se había conectado previamente con SirA y Csr.

La expresión de los genes necesarios para la síntesis del flagelo y para la quimiotaxis se controlan positivamente por el regulador transcripcional FlhDC (Chilcott & Hughes, 2000). Estudios previos indican que CsrA se une y estabiliza al transcrito de *flhDC*, incrementando su expresión y, de esta manera, CsrA induce la expresión del regulón de FlhDC (Vakulskas *et al.*, 2015). Así, SirA y CsrB/C, antagonistas de CsrA, tendrían un efecto negativo para la expresión de los genes flagelares y de quimiotaxis. Nuestro análisis proteómico reveló una regulación negativa por SirA y/o CsrB/C sobre 12 genes del regulón de FlhDC (FlgL, CheZ, FlgN, FliT, FliG, YcgR, CheM, Tsr, Aer, SL3126, FlgK y Trg).

En nuestro análisis proteómico, se identificaron en total 12 proteínas relacionadas a la movilidad, como reguladas por SirA y/o CsrB/C (Anexo 1). En estudios previos se habían identificado 10 de estas 12 proteínas, como reguladas por SirA y/o Csr en *Salmonella* o en *E. coli* (Lawhon *et al.*, 2003; Edwards *et al.*, 2011; McKee *et al.*, 2012; Zere *et al.*, 2015; Esquerré *et al.*, 2016; Holmqvist *et al.*, 2016). Las nuevas proteínas que se identificaron en nuestro trabajo, como reguladas por SirA y/o CsrB/C son YcgR y Trg, involucradas en la quimiotaxis.

Se ha descrito que CsrA reprime o activa la expresión de genes involucrados en diferentes vías metabólicas (Timmermans & Van Melderen, 2010). Por ejemplo, reprime la expresión de genes para la glucogénesis y gluconeogénesis, mientras que activa la expresión de genes para la glucólisis (Sabnis *et al.*, 1995; Romeo, 1998). Además, se ha descrito que el Csr también activa y/o reprime la expresión de los genes que participan en otras vías del metabolismo central del carbono, como el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) o la vía de las pentosas fosfato (PP) (McKee *et al.*, 2012). Así, se esperaría un efecto de SirA y CsrB/C, contrario al de CsrA, en la expresión de estos genes. Nuestro estudio proteómico reveló una regulación positiva por SirA y/o CsrB/C sobre los genes *glgC* y *glgB* para la glucogénesis, una regulación tanto negativa sobre el gen *sdhB* y positiva sobre el

gen *acnA* para el TCA y una regulación negativa sobre *tktB* para la vía PP (Figura 8 y Anexo 1).

Se ha descrito que en condiciones de crecimiento que mimetizan el ambiente del lumen intestinal, se generan dos poblaciones de *Salmonella* que expresan diferencialmente sus genes de virulencia. Una población de bacterias expresa los genes de SPI-1 y por lo tanto son capaces de invadir las células del epitelio intestinal y de inducir inflamación intestinal, mientras que la otra población de bacterias que no expresa los genes de SPI-1, se replica en el lumen intestinal (Sturm *et al.*, 2011) (Figura 19A). La replicación de *Salmonella* en el lumen intestinal requiere de la expresión de genes que permiten usar fuentes de carbono específicas que se generan en el intestino inflamado, lo cual representa una ventaja adaptativa de *Salmonella* con respecto a las bacterias de la microbiota intestinal que no pueden replicarse en el intestino inflamado (Stecher *et al.*, 2007; Rivera-Chávez *et al.*, 2017). Entre los genes que permiten la replicación de *Salmonella* en el lumen del intestino inflamado son los codificados en los operones *pdu*, *eut*, *cbi*, *ttr* (codificado en SPI-2), *phs* y *asr*. Los genes de los operones *pdu* y *eut* permiten la utilización de propanediol y etanolamina como fuentes alternativas de carbono de manera anaeróbica al utilizar vitamina B₁₂, que *S. Typhimurium* sintetiza a partir de las enzimas codificadas en el operón *cbi*; asimismo, las enzimas codificadas por los operones *ttr*, *phs* y *asr*, permiten la utilización del tetrionato como aceptor de electrones en el ambiente anaeróbico intestinal (Price-Carter *et al.*, 2001; Winter *et al.*, 2010; Yoo *et al.*, 2017).

Como se describió anteriormente, nuestros resultados y diferentes estudios previos, indican que SirA y CsrB/C regulan positivamente la expresión de los genes de SPI-1 (Figura 8 y Anexo 1) (Martínez *et al.*, 2011). Interesantemente, nuestro análisis proteómico mostró que SirA y/o CsrB/C regulan negativamente la expresión de genes requeridos para la replicación de *Salmonella* en el intestino inflamado (PduD, PduE, PduP, PduQ, PduS, DhaB, PduA, PocR y CbiC) (Figura 8 y Anexo 1). En apoyo a estos resultados, en un estudio previo de transcriptomas se encontró que CsrA induce la expresión de los genes *pduA* y *cbiC* (Lawhon *et al.*, 2003). Asimismo, se encontró mediante predicción bioinformática que CsrA se une al transcrito de *pduD* y, además, en un estudio de RNAseq se encontró que SirA reprime la expresión de *pduA* y *pduE* (Kulkarni *et al.*, 2014; Colgan *et al.*, 2016). Cabe hacer notar que estos genes no se encuentran en *E. coli* K-12. En conjunto, estos resultados sugieren que los sistemas BarA/SirA y Csr están involucrados en el mecanismo de regulación que genera dos poblaciones de *Salmonella* con diferentes propiedades de virulencia; cuando se active el sistema BarA/SirA se expresarían los genes de SPI-1 y se reprimirían los genes para la replicación en el intestino inflamado, cuando se inactive el sistema BarA/SirA sucedería lo contrario (Figura

19B). Respecto a esto, se ha reportado que diferentes ácidos grasos presentes en el intestino activan o reprimen la expresión de los genes de SPI-1, varios de los cuales actúan a través del sistema BarA/SirA; por ejemplo, el acetato activa su expresión, mientras que el propionato y butirato la reprimen (Lawhon *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2013). El propio propionato producido a partir del metabolismo del propanediol (por las bacterias que se replican en el lumen intestinal) reprimiría la expresión de los genes de SPI-1, formándose así un circuito de regulación adicional entre estos dos procesos de invasión y replicación extracelular de *Salmonella* en el intestino (Yoo *et al.*, 2017).

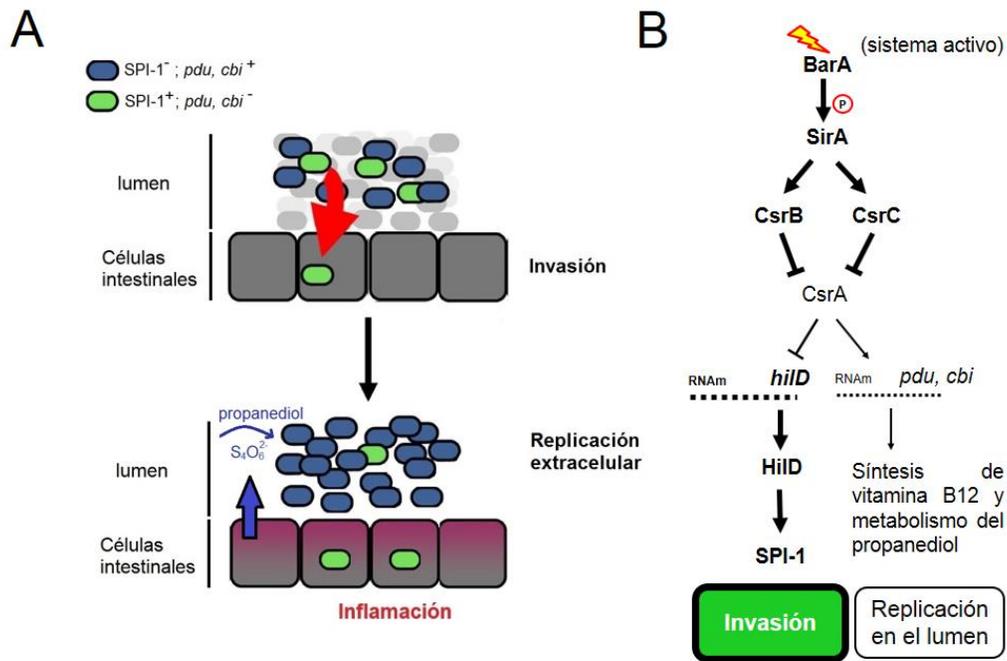


Fig. 19. Los sistemas de regulación BarA/SirA y Csr están involucrados en la generación de dos poblaciones de *S. Typhimurium* en el lumen. (A) En el lumen intestinal, las bacterias que expresan a SPI-1 (mostradas en verde), son capaces de invadir a las células intestinales promoviendo el proceso inflamatorio de estas células; a su vez, el proceso inflamatorio induce la producción del aceptor de electrones tetrationato (S₄O₆²⁻). Las bacterias que no expresan a SPI-1 (mostradas en azul), son capaces de utilizar fuentes alternativas de carbono como el propanediol y usar el tetrationato como aceptor de electrones, para replicarse y sobrevivir en en el lumen y, de esta manera, estas bacterias serían capaces de infectar nuevamente a las células intestinales (Tomado y modificado de Diard & Hardt, 2017). **(B)** Cascada de regulación de los sistemas BarA/SirA y Csr sobre la regulación de genes necesarios para la invasión de *S. Typhimurium* a células intestinales o sobre genes necesarios para la replicación de la bacteria en el lumen intestinal. Cuando el sistema BarA/SirA se activa por las señales presentes en el lumen, se expresan los sRNAs CsrB/C que capturan a CsrA, por lo que se activa la expresión de los genes de invasión (SPI-1) y se reprimen los genes de los operones *pdu* y *cbi*, que codifican para las proteínas necesarias para la utilización del propanediol como fuente alternativa de carbono. En ausencia de la señal requerida para activar al sistema BarA/SirA, CsrA reprime a SPI-1 y permite que la bacteria se replique en el lumen intestinal, al activar la expresión de los genes de los operones *pdu* y *cbi*.

En nuestro análisis proteómico, se identificaron en total 78 proteínas relacionadas al metabolismo, como reguladas por SirA y/o CsrB/C, 32 reguladas positivamente y 46 negativamente (Anexo 1). En estudios previos se habían identificado 55 de estas

78 proteínas, como reguladas por SirA y/o Csr en *Salmonella* o en *E. coli* (Lawhon *et al.*, 2003; Edwards *et al.*, 2011; McKee *et al.*, 2012; Kulkarni *et al.*, 2014; Zere *et al.*, 2015; Holmqvist *et al.*, 2016; Esquerré *et al.*, 2016; Colgan *et al.*, 2016; Sowa *et al.*, 2017). Las nuevas proteínas que se identificaron en nuestro trabajo, como reguladas por SirA y/o CsrB/C son: HutU, HutH, SL4470, SL2313, Fucl, SL4396, TdcG, CadA, SL1490, SL1488, SLP1_0061, MurQ y AllC (involucradas en el metabolismo de carbono y aminoácidos), PduP, PduQ, PduS, DhaB y PocR (involucradas en el metabolismo del propanediol), SL1071, AsrB, YdgJ, AsrC y SL2374 (involucradas en procesos de óxido-reducción).

En un estudio previo, se describió que RpoS, el factor σ^S de respuesta a estrés que promueve la transcripción de genes necesarios durante la fase estacionaria de crecimiento, activa la expresión de CsrA (Dong & Schellhorn, 2009; Yakhnin *et al.*, 2011). Recientemente, se identificó que CsrA reprime la expresión de RpoS (Sowa *et al.*, 2017). Adicionalmente, se identificaron otras funciones celulares relacionadas con CsrA en estudios de inmunoprecipitaciones, como replicación, recombinación y reparación del DNA, metabolismo de proteínas y transporte (Edwards *et al.*, 2011; Sowa *et al.*, 2017). Nuestro estudio proteómico reveló una regulación positiva por SirA y/o CsrB/C sobre los genes *rpoS*, *osmE*, *dps* y *uspA* que están involucrados en la respuesta a estrés. Además, encontramos una regulación positiva por SirA y/o CsrB/C sobre los genes *SL1423*, *nhaR*, *yehZ* y *argT* (actividad de transporte), *yeco* (modificación del RNA), *ung* (reparación del DNA), y una regulación negativa sobre los genes *ssb* (recombinación del DNA), *tgt*, *trmJ*, *yqcB*, *rnc*, *rhIB* (modificación y procesamiento del RNA), entre otros (Figura 8 y Anexo 1).

En nuestro análisis proteómico, se identificaron en total 24 proteínas relacionadas a otras funciones celulares, como reguladas por SirA y/o CsrB/C, 11 reguladas positivamente y 13 negativamente (Anexo 1). En estudios previos se habían identificado 20 de estas 24 proteínas, como reguladas por SirA y/o Csr en *Salmonella* o en *E. coli* (Edwards *et al.*, 2011; McKee *et al.*, 2012; Kulkarni *et al.*, 2014; Zere *et al.*, 2015; Holmqvist *et al.*, 2016; Esquerré *et al.*, 2016; Sowa *et al.*, 2017). Las nuevas proteínas que se identificaron en nuestro trabajo, como reguladas por SirA y/o CsrB/C son SL1423 y YrbD (con actividad de transporte transmembranal y de fosfolípidos, respectivamente), Tgt (modificación del RNA) y SogL (replicación del DNA).

Nuestro análisis proteómico reveló regulación por SirA y/o CsrB/C de 22 proteínas (13 reguladas positivamente y 9 negativamente) a las cuales no se les pudo asignar una probable función (SL1780, SL3653, YbaY, YebF, YjbJ, YdeJ, YhcH, YdeI, YdcJ, YchN, YgiW, ElaA, YdiH, YgfB, YifE, YcgL, SL1061, YhcB, YegQ, SL1969, SLP2_0011 y YqcC) (Figura 8 y Anexo 1). Los genes que codifican para 20 de estas proteínas se conservan en *E. coli* K-12, los otros dos genes, *SL1061* y *SLP2_0011*,

se encuentran sólo en *Salmonella*, en el cromosoma y el plásmido de virulencia, respectivamente. En estudios previos se habían identificado 19 de estas 22 proteínas, como reguladas por SirA y/o Csr en *Salmonella* o en *E. coli* (Edwards *et al.*, 2011; McKee *et al.*, 2012; Kulkarni *et al.*, 2014; Zere *et al.*, 2015; Holmqvist *et al.*, 2016; Esquerré *et al.*, 2016; Colgan *et al.*, 2016; Sowa *et al.*, 2017). Las nuevas proteínas que se identificaron en nuestro trabajo, como reguladas por SirA y/o CsrB/C son SL1061, YegQ y SLP2_0011.

Para comenzar la caracterización a mayor detalle del regulón de SirA y/o CsrB/C definido en este estudio, se seleccionaron las proteínas YdcJ, YebF y SL2374, las cuales son proteínas de función desconocida o putativa. Nuestro análisis de expresión mediante fusiones traduccionales al gen reportero *lacZ* confirmó la regulación por SirA y/o CsrB/C de la expresión de los genes *ydcJ* y *yebF* (Figura 12A y B); asimismo, mostró una regulación por CsrA de estos genes, contraria a la de SirA y/o CsrB/C, como se esperaba (Figura 13A y B). La fusión a *lacZ* del gen *SL2374* no mostró regulación por SirA y/o CsrB/C (Figura 12C). Es probable que los fragmentos de DNA que se usaron para la construcción de esta fusión no contengan todos los elementos para su regulación por SirA y/o CsrB/C; alternativamente, el resultado para este gen podría representar un falso positivo del análisis de proteomas. La regulación de la expresión de YebF por SirA, CsrB/C y CsrA se confirmó también por ensayos de Western blot (Figura 14).

YebF (SL1815) es una proteína de 13 kDa (117 aminoácidos), cuya secuencia tiene 76% de identidad con su ortólogo de *E. coli* K-12, pero no presenta algún dominio funcional evidente. En *E. coli*, YebF se transloca al periplasma mediante la vía de secreción general Sec (Zhang *et al.*, 2006); después, YebF es secretada al medio extracelular a través de las porinas OmpC y OmpF (Prehna *et al.*, 2012). Aunque no se ha definido la función de YebF en *E. coli*, esta proteína ha sido ampliamente usada para secretar proteínas recombinantes de interés fusionadas a su extremo C-terminal (Zhang *et al.*, 2006). Nosotros mostramos que YebF también se secreta en *S. Typhimurium* (Figura 15). Esto resulta interesante, debido a que se podrían utilizar cepas atenuadas de *S. Typhimurium* en donde se utilice a YebF para la producción y secreción de otras proteínas para combatir a otros patógenos en el lumen intestinal de los hospederos. Por otro lado, en este trabajo mostramos que YebF no se requiere para la movilidad de *S. Typhimurium*, ni para la invasión o replicación intracelular de *S. Typhimurium* en células HeLa (Figura 16 y 17). Así, la función celular de YebF en *S. Typhimurium* queda por determinarse.

En general, se ha visto que SirA y sus ortólogos en otras bacterias regulan la expresión de sus genes blanco a través de los sRNAs CsrB y CsrC, o sus ortólogos (Suzuki *et al.*, 2002; Fortune *et al.*, 2006; Vakulskas *et al.*, 2015). Sin embargo, en un estudio reciente de ChIP-seq con SirA/UvrY(-FLAG) se encontró mayormente

enriquecida la región reguladora de los genes *csrB* y *csrC*, pero también se encontró que SirA/UvrY son capaces de unirse a otros genes, aunque la señal de unión fue menor (Zere *et al.*, 2015). Así, para investigar más sobre esto, se hizo una comparación directa entre los proteomas que obtuvimos en ausencia de SirA y en ausencia de CsrB/C. La expresión de 25 proteínas se afectó diferencialmente en ausencia de SirA con respecto a la ausencia de CsrB/C (Figura 8 y Anexo 1), los cuales cumplieron con los parámetros estadísticos que establecimos para considerar como significativo los cambios en la expresión (diferencia de 2 veces y $p \leq 0.05$) (Anexo 2 y 3); la mayoría de estas proteínas se habían identificado previamente cuando se compararon las mutantes con la cepa WT (Figura 7, Anexo 1). La expresión de 8 proteínas se incrementó (InvB, PrgI-SipD, SptP, TrpA, DkgB, CbiP, ElaA y YdiH) y la de 17 se disminuyó (SirA, Trg, SL2944, FdoG, DdiB, AroH, RhlB, YrbD, YihI, YqcB, YeiP, NuoA, TruA, RepA2, YbaX, SLP2_0011 y YqcC) en ausencia de SirA, con respecto a la ausencia de CsrB/C. Sin embargo, 4 de estas 25 proteínas mostraron un patrón de expresión similar en ausencia de SirA y en ausencia de CsrB/C (InvB, PrgI-SipD, SptP y Trg), con respecto a la presencia de ambos reguladores, sólo que el efecto observado fue mayor en ausencia de SirA o CsrB/C. Como era esperado, la expresión de la proteína SirA se reprimió en la ausencia de SirA, representando un control de nuestro estudio. Las restantes 20 proteínas mostraron un patrón de expresión diferente en ausencia de SirA y en ausencia de CsrB/C (Figura 8, Anexo 2 y 3).

Para 3 de estas últimas 20 proteínas (SLP2_0011, CbiP y YqcC) se analizó su expresión mediante fusiones traduccionales al gen *lacZ*. Sin embargo, con estas fusiones no se observó la regulación por SirA y/o CsrB/C sobre los genes *SLP2_0011* y *cbiP* (Figura 12 D y E). A diferencia, la expresión de la fusión del gen *ycqC* se incrementó significativamente en ausencia de CsrB/C (Figura 12F), pero no en ausencia de SirA, un patrón de expresión similar al que se encontró en nuestro análisis proteómico (Figura 8, Anexo 1 y 2). Interesantemente, la sobre-expresión de CsrA incrementó la expresión de *ycqC*, mientras que la sobre-expresión de CsrB (que atrapa a CsrA) la disminuyó (Figura 13C). Así, el efecto diferencial de la ausencia de SirA y la ausencia de CsrB/C observado para la expresión de *ycqC*, y probablemente para otros genes, podría deberse a un diferente nivel de CsrA libre para actuar; en ausencia de SirA puede haber expresión basal de CsrB/C (Suzuki *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2014), lo cual atraparía cierto número de moléculas de CsrA, mientras que en ausencia de CsrB/C todas las moléculas de CsrA quedarían libres (ya que en *S. Typhimurium* no se ha reportado otro factor diferente a CsrB/C que atrape a CsrA). El número de moléculas libres podría impactar diferencialmente de acuerdo a la afinidad de unión de CsrA a cada uno de sus genes blanco. Si esto aplica para el resto de los genes que mostraron un patrón de expresión diferente en ausencia de SirA y en ausencia de CsrB/C queda por ser definido. Nuestros

resultados revelan que puede haber efecto diferencial de la ausencia de SirA y de la ausencia de CsrB/C, sobre todo en la expresión de las proteínas CbiP, DdIB, RepA2 y YbaX (Figura 8, Anexo 1, 2 y 3); sin embargo, se necesitan de más estudios para definir si existe una vía de regulación por SirA independiente de CsrB/C.

En nuestro trabajo también mostramos que los sistemas BarA/SirA y Csr controlan la expresión de HilE (Figura 18), una proteína que interacciona e inactiva a HilD, el regulador positivo central de los genes de SPI-1 (Baxter *et al.*, 2003). En nuestro análisis de proteómica no se identificó a HilE, probablemente debido a su bajo nivel de expresión. Las proteínas poco abundantes pueden no generar los péptidos suficientes para su detección (Zhou *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2011). Además, la intensidad de la señal de un determinado péptido también depende de la eficiencia de la ionización y, por consiguiente, la correcta separación de los iones en el espectrómetro de masas (Xie *et al.*, 2011). Nuestros resultados indican que SirA y CsrB/C regulan positivamente la expresión de HilE, mientras que CsrA lo hace negativamente (Figura 18). SirA y CsrB/C también regulan positivamente, y CsrA negativamente, la expresión de HilD (Martínez *et al.*, 2011). Así, SirA y CsrB/C inducen la expresión de los genes de SPI-1 a través de inducir la expresión de HilD, pero también inducen la expresión de HilE que inactiva a HilD (Figura 20A). Estos resultados parecerían ser contradictorios; sin embargo, HilE no inactiva en su totalidad la acción de HilD, sino que más bien actúa como un modulador de su actividad. La sobre-expresión de los genes de SPI-1 retarda el crecimiento de *Salmonella* y la acción de HilE permitiría la expresión de los genes de SPI-1 a un nivel que no llegue a ser perjudicial (Sturm *et al.*, 2011) (Figura 20B). Nuestros resultados revelaron un nuevo circuito de regulación que controla la expresión de los genes de virulencia de *Salmonella*, en el que SirA y CsrB/C inducen la expresión de los genes de SPI-1 a través de HilD y a la vez inducen la expresión de HilE para modular la actividad de HilD y así la expresión de los genes de SPI-1 (Figura 20).

En nuestro estudio encontramos 165 proteínas (incluyendo a HilE) cuya expresión se regula por SirA y CsrB/C, 34 (incluyendo a HilE) de las cuales representan nuevos blancos de estos reguladores en *Salmonella* o *E. coli*. Aunque nuestros resultados proteómicos indican un efecto diferencial en la ausencia de SirA y en la ausencia de CsrB/C, se requieren de más estudios para comprobar si SirA actúa de manera independiente de CsrB/C.

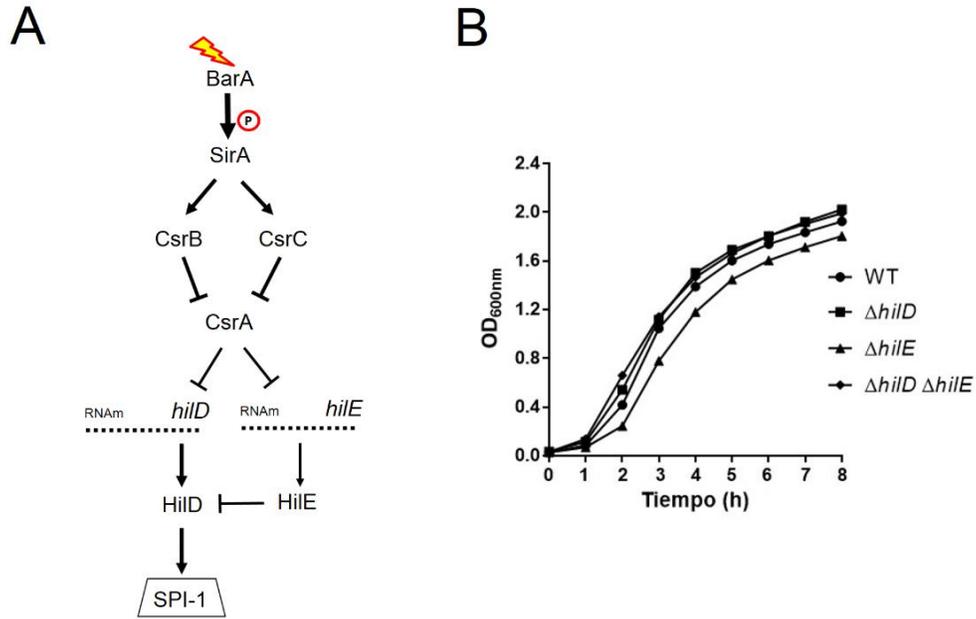


Fig. 20. Los sistemas BarA/SirA y los sRNAs CsrB/C regulan negativamente a los genes de SPI-1, inhibiendo el efecto adverso en el crecimiento por la sobre-expresión de estos genes. (A) El sistema BarA/SirA y los sRNAs CsrB/C regulan positivamente la expresión los genes de SPI-1 a través de HilD, pero también regulan negativamente la expresión de estos genes a través de HilE. **(B)** HilE inhibe que la sobre-expresión de los genes de SPI-1 sea perjudicial para el crecimiento de *S. Typhimurium*. Cinética de crecimiento de la cepa WT de *S. Typhimurium* y sus derivadas mutantes $\Delta hilD$, $\Delta hilE$ y $\Delta hilD \Delta hilE$, crecidas en medio LB a 37°C. En la gráfica se muestran los datos de OD_{600nm} promedio de tres experimentos diferentes hechos por duplicado.

CONCLUSIONES

En nuestro análisis proteómico encontramos 164 proteínas cuya expresión se afectó por la ausencia de SirA y/o CsrB/C, 81 mostraron regulación negativa y 83 mostraron una regulación positiva. 33 de estas 164 proteínas representan nuevos blancos de SirA y/o CsrB/C en *Salmonella*.

Las nuevas proteínas encontradas en este estudio, como reguladas por SirA y/o CsrB/C son: SrfB (virulencia); YcgR y Trg (movilidad); HutU, HutH, SL4470, SL2313, Fucl, SL4396, TdcG, CadA, SL1490, SL1488, SLP1_0061, MurQ, AIIc, PduP, PduQ, PduS, DhaB, PocR, SL1071, AsrB, YdgJ, AsrC y SL2374 (metabolismo); SL1423, YrbD, Tgt y SogL (otras funciones); y SL1061, YegQ y SLP2_0011 (función desconocida).

Para las proteínas YdcJ, YebF y YqcC, se confirmó su regulación por SirA y/o CsrB/C/A mediante análisis de expresión con fusiones traduccionales al gen reportero *lacZ*; para el caso de YebF también por ensayos de Western blot. Nuestros resultados indican que YebF se secreta, pero no se requiere para movilidad, invasión o replicación intracelular de *S. Typhimurium* en células HeLa.

En este trabajo demostramos que SirA y CsrB/C/A también regulan la expresión de la proteína HilE, la cual interacciona e inactiva a HilD, regulador positivo central de los genes de SPI-1. Con esto se establece un nuevo circuito de regulación que controla la expresión de genes de virulencia en *Salmonella*.

PERSPECTIVAS

Complementar las cepas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$ para confirmar la regulación de *ycdJ*, *yebF* y *hilE* por SirA y/o CsrB/C.

Analizar la expresión de las fusiones *ycdJ-lacZ*, *yebF-lacZ*, y *yqcC-lacZ* en una cepa mutante $\Delta barA$, así como la expresión de *ycdJ*, *yqcC*, *SL2374*, *SLP2_0011* y *cbiP* mediante Western blot.

Determinar si la expresión de *hilE*, *ycdJ*, *yebF*, *yqcC*, *SL2374*, *SLP2_0011* y *cbiP* responde a acetato, butirato y propionato.

Confirmar la regulación de los nuevos genes blanco de los sistemas BarA/SirA y Csr identificados en este trabajo, mediante ensayos de Western blot y análisis de expresión con fusiones traduccionales al gen reportero *lacZ*.

Analizar la probable función celular de los nuevos genes blanco de los sistemas BarA/SirA y Csr identificados en este trabajo, en la virulencia y fisiología de *S. Typhimurium*.

ANEXO 1. Datos obtenidos en este estudio

Proteínas reprimidas (83) en una o en ambas cepas mutantes $\Delta csrB$ $\Delta csrC$ y $\Delta sirA$

Proteína	p-value	$\Delta csrB$ $\Delta csrC/WT$ ^a	p-value	$\Delta sirA/WT$ ^a	p-value	$\Delta sirA/\Delta csrB$ $\Delta csrC$ ^a	Proceso biológico	Presente en <i>E. coli</i> K-12	Conectado previamente con CsrA ^b
Relacionadas a SPI-1									
InvB	0.0005	0.2	0.0025	0.5	0.00039	2.1	chaperona	No	sCo-IP1, sMic, sRNA
PrgI-SipD	0.00033	0.2	0.00081	0.5	0.0034	2.3	sistema de secreción	No	sCo-IP1, sMic, sRNA
SptP	< 0.00010	0.03	< 0.00010	0.2	0.0089	5.8	proteína efectora	No	sPred1, sMic, sRNA
HilC	0.02	0	0.02	0	1	INF	regulación de la transcripción	No	sMic, sRNA
HilD	0.013	0	0.027	0.1	0.37	INF	regulación de la transcripción	No	sCo-IP1, sPred1, sMic, sCo-IP2, sRNA
SicP	0.00064	0	0.00064	0	1	INF	chaperona	No	sCo-IP1, sMic, sRNA
InvC	< 0.00010	0	< 0.00010	0.03	0.37	INF	sistema de secreción	No	sMic, sRNA
PrgH	0.032	0	0.047	0.09	0.37	INF	sistema de secreción	No	sCo-IP2, sMic, sRNA
SopA	0.0002	0	0.0002	0	1	INF	proteína efectora	No	sCo-IP1, sMic, sRNA
SopD	0.0016	0	0.0016	0	1	INF	proteína efectora	No	sCo-IP1, sRNA
AvrA	0.0069	0	0.0069	0	1	INF	proteína efectora	No	sRNA
InvJ	0.017	0.04	0.034	0.2	0.073	5.9	sistema de secreción	No	sMic, sRNA
PipC	< 0.00010	0.09	0.0002	0.3	0.044	2.8	chaperona	No	sCo-IP1, sMic, sRNA
SiiE	0.0072	0.1	0.0083	0.1	0.44	1.4	proteína efectora	No	sCo-IP1, sRNA
SipA	0.0038	0.2	0.0071	0.3	0.19	1.4	proteína efectora	No	sCo-IP1, sPred1, sMic, sRNA
SspD	0.00077	0.2	0.0058	0.4	0.075	1.9	proteína efectora	No	sCo-IP1, sMic, sRNA
OrgAB	0.0013	0.3	< 0.00010	0.3	0.87	1	sistema de secreción	No	sMic, sRNA
RtsA	0.0053	0.3	0.016	0.4	0.2	1.5	regulación de la transcripción	No	sRNA
SopE	0.033	0.3	0.033	0.3	0.76	1.1	proteína efectora	No	sMic, sRNA
SspC	0.022	0.3	0.025	0.3	0.61	1.1	proteína efectora	No	sCo-IP1, sMic, sRNA
SopB	0.0059	0.3	0.03	0.5	0.028	1.8	proteína efectora	No	sCo-IP1, sMic, sRNA
SipB	0.018	0.4	0.029	0.4	0.16	1.2	proteína efectora	No	sCo-IP1, sMic, sRNA
PhoN	0.13	0.7	0.012	0.3	0.1	0.4	desfosforilación	No	sCo-IP2
SicA	0.031	0.3	0.058	0.4	0.34	1.4	chaperona	No	sMic, sRNA
HilA	0.00076	0.4	0.0029	0.6	0.05	1.7	regulación de la transcripción	No	sCo-IP1, sCo-IP2, sMic, sRNA
SpaO	0.0024	0.4	0.0047	0.6	0.088	1.7	sistema de secreción	No	sCo-IP1, sMic, sRNA
Otras de virulencia									
FimC	0.016	0.1	0.0082	0	0.37	0	adhesión celular	Si	ePred1, eMic, eCo-IP3
Metabolismo									
MurQ	0.017	0.5	0.027	0.5	0.79	1.1	metabolismo de carbono y aminoácidos	Si	-
AlcC	0.0069	0	0.0069	0	1	INF	Metabolismo de nucleótidos y aminoácidos	Si	-

HisD	0.05	0.2	0.05	0.2	1	1	metabolismo de aminoácidos	Si	eCo-IP3
CadA	0.025	0.4	0.042	0.5	0.056	1.3	metabolismo de aminoácidos	Si	-
GlgC	0.025	0.2	0.029	0.4	0.26	1.9	metabolismo de carbono	Si	eProtA, ePred1, sPred1, eProtB, ePred2, eCo-IP1, eMic, eCo-IP3
SL1490	0.0035	0.2	0.0095	0.4	0.61	1.3	metabolismo de carbono	No	-
Udg	0.0009	0.4	0.008	0.5	0.46	1.2	metabolismo de carbono	Si (Ugd)	eCo-IP1
YjeF	0.014	0.5	0.024	0.4	0.71	0.9	metabolismo de carbono	Si	eCo-IP1, eMic
YnhG	0.0038	0	0.0038	0	1	INF	biogénesis de la pared celular	Si (LdtE)	eCo-IP1, eMic, eCo-IP3
Mpl	0.024	0.5	0.047	0.5	0.92	1	biogénesis de la pared celular	Si	ePred2, eMic, eCo-IP3
KatN	0.00065	0	0.00065	0	1	INF	transporte de iones y metabolismo	No	sCo-IP1
YciF	< 0.00010	0.2	< 0.00010	0.2	0.93	1	transporte de iones y metabolismo	Si	sCo-IP1, sRNA
GabD	0.55	0.8	0.032	0.3	0.11	0.4	metabolismo de carbono y aminoácidos	Si	eProtA, sCo-IP1, eCo-IP1, eMic, eCo-IP3
SL2163	0.21	0.8	0.014	0.5	0.084	0.7	metabolismo de carbono y aminoácidos	Si (Yjhc)	eMic
HisF	0.44	0.7	0.019	0.09	0.18	0.2	metabolismo de aminoácidos	Si	eProtB, eCo-IP3
SL1488	0.052	0.2	0.021	0.03	0.091	0.1	metabolismo de carbono	No	-
AcnA	0.014	0.7	0.01	0.5	0.3	0.8	metabolismo de carbono	Si	eProtA, sCo-IP1, eProtB, eCo-IP3
Epd	0.055	0.6	0.0087	0.5	0.56	0.9	metabolismo de cofactores y vitaminas	Si	eMic, eCo-IP3
NapA	0.071	0.6	0.036	0.5	0.021	0.8	procesos de óxido-reducción	Si	eCo-IP1, sRNA
YfdZ	0.033	0.5	0.48	0.8	0.37	1.6	metabolismo de aminoácidos	Si (AlaC)	sPred1, eMic
OtsB	0.015	0	0.054	0.2	0.37	INF	metabolismo de carbono	Si	eProtA, sCo-IP1, eMic, eCo-IP3
GlgB	0.0094	0.1	0.19	0.5	0.25	4	metabolismo de carbono	Si	eProtA, eProtB, eCo-IP1, eMic, eCo-IP2, eCo-IP3
SLP1_0061	0.018	0.1	0.082	0.5	0.11	3.9	metabolismo de carbono	No	-
LdhA	0.021	0.4	0.13	0.6	0.44	1.4	metabolismo de carbono	Si	eCo-IP3
OtsA	0.045	0.4	0.1	0.5	0.56	1.4	metabolismo de carbono	Si	sCo-IP1, eMic, eCo-IP3
YibF	0.023	0.5	0.042	0.6	0.12	1.3	metabolismo de carbono	Si	ePred2, eCo-IP2
TktB	0.042	0.5	0.21	0.7	0.25	1.3	metabolismo de carbono	Si	eProtA, sCo-IP1, ePred2, eCo-IP3
WrbA	0.0069	0.5	0.65	1.4	0.34	2.7	metabolismo de cofactores y vitaminas	Si	eProtA, eMic, eCo-IP3
SL2374	0.012	0.4	0.064	0.5	0.99	1	procesos de óxido-reducción	No	-
DkgA	0.037	0.5	0.15	0.7	0.43	1.4	procesos de óxido-reducción	Si	eProtA, eCo-IP1, eMic, eCo-IP3
YncB	0.047	0.5	0.26	0.7	0.45	1.3	procesos de óxido-reducción	Si (CurA)	eCo-IP1, eCo-IP3
TrpA	0.016	0.3	0.14	0.8	0.019	2.9	metabolismo de aminoácidos	Si	eMic, eCo-IP3
Otras funciones									

Ung	0.013	0	0.013	0	1	INF	reparación del DNA	Si	sPred1
RpoS	0.00045	0	0.006	0.2	0.12	INF	respuesta a estrés	Si	eProtA, eCo-IP3
RplW	0.041	0.4	0.0043	0.1	0.16	0.3	traducción	Si	eCo-IP1, eCo-IP3
SL1423	0.0074	0	0.0074	0	0.59	0.9	actividad de transportador	No	-
NhaR	0.034	0	0.034	0	1	INF	actividad de transportador	Si	eProtA, ePred2, eCo-IP1, eMic, eCo-IP3
YehZ	< 0.00010	0.4	0.0037	0.5	0.041	1.4	actividad de transportador	Si (OsmF)	eMic, eCo-IP3
OsmE	0.68	0.9	0.016	0.3	0.1	0.4	respuesta a estrés	Si	eProtA, ePred1, sPred1, eCo-IP3
Dps	0.0027	0.6	0.0039	0.5	0.053	0.8	respuesta a estrés	Si	eProtA, eCo-IP1, eMic, eCo-IP2, eCo-IP3
UspA	0.0082	0.7	0.027	0.5	0.29	0.8	respuesta a estrés	Si	sCo-IP1, ePred1, sPred2, eProtB, eCo-IP1, eMic, eCo-IP2, eCo-IP3
ArgT	0.58	1.6	0.02	0	0.16	0	actividad de transportador	Si	eCo-IP3
YecO	0.0069	0	0.92	1.1	0.2	INF	modificación del RNA	Si (CmoA)	eMic
Función desconocida									
SL1780	0.00046	0	0.00046	0	1	INF	función desconocida	Si (YebV)	eProtA, ePred2, eMic, eCo-IP3
SL3653	0.02	0	0.02	0	1	INF	función desconocida	Si (YibT)	ePred2, eMic, sCo-IP2, eCo-IP3
YbaY	0.024	0.2	0.0046	0	0.13	0	función desconocida	Si	ePred2, eMic, sRNA, eCo-IP3
YebF	0.0024	0.4	0.0023	0.4	0.37	1	función desconocida	Si	eProtA, sCo-IP1, ePred2, eCo-IP3
YjbJ	0.021	0.5	0.03	0.5	0.71	1.2	función desconocida	Si	sCo-IP1, eCo-IP1, eMic, eCo-IP3
YdeJ	0.3	0.6	0.0035	0	0.12	0	función desconocida	Si	eMic
YhcH	0.055	0.5	0.049	0.4	0.91	1	función desconocida	Si	ePred2, eCo-IP3
YdeI	0.089	0.5	0.035	0.4	0.73	0.8	función desconocida	Si	sCo-IP1, eCo-IP2, eCo-IP3
YdcJ	0.048	0.4	0.063	0.4	0.95	1	función desconocida	Si (YdcJ)	eProtA, sCo-IP1, eCo-IP3
YchN	0.021	0.4	0.89	0.9	0.25	2.2	función desconocida	Si	eProtA, eMic, eCo-IP3
YgiW	0.019	0.5	0.046	0.6	0.44	1.2	función desconocida	Si	eProtA, sCo-IP1, sPred1, ePred2, eMic, eCo-IP3
ElaA	0.017	0.3	0.87	1	0.031	3.4	función desconocida	Si	ePred2
YdiH	0.0002	0.4	0.36	1.3	0.039	3.9	función desconocida	Si	eMic, eCo-IP3

^a INF: División entre cero, es decir que no se expresa la cepa del denominador (WT ó $\Delta csrB \Delta csrC$)

^b **Abreviaturas:**

eProtA: Proteómica en cepa *csrA51* y $\Delta csrB \Delta csrC$ en *E. coli* K-12 (Sowa et al., 2017)

sCo-IP1: Co-Imunoprecipitación con CsrA-3XFLAG en *S. Typhimurium* SL1344 (Holmqvist et al., 2016)

ePred1: Predicción bioinformática de sitios de unión de CsrA en *E. coli* K-12 (Kulkarni et al., 2014)

sPred1: Predicción bioinformática de sitios de unión de CsrA en *S. Typhimurium* LT2 (Kulkarni et al., 2014)

eProtB: Proteómica sobre-expresando a CsrB en *E. coli* K-12 (McKee et al., 2012)

ePred2: Predicción bioinformática de sitios de unión de CsrA en *E. coli* K-12 (McKee et al., 2012)

eCo-IP1: Co-Imunoprecipitación con CsrA-His6 en *E. coli* K-12 (Edwards et al., 2011)

eMic: Microarreglos en cepa *csrA51* en *E. coli* K-12 (Esquerré et al., 2016)

eCo-IP2: Co-Imunoprecipitación de UvrY-FLAG en *E. coli* K-12 (Zere et al., 2015)

sCo-IP2: Co-Imunoprecipitación de SirA-FLAG en *S. Typhimurium* 14028S (Zere et al., 2015)

sMic: Microarreglos en cepa $\Delta csrA$ en *S. Typhimurium* 14028S (Lawhon et al., 2003)

sRNA: RNAseq en cepa $\Delta barA/sirA^{432}$ en *S. Typhimurium* 4/74 (Colgan et al., 2016)

eCo-IP3: HITS-CLIP con CsrA-FLAG en *E. coli* K12 (Sowa et al., 2017)

Proteínas activadas (81) en una o en ambas cepas mutantes $\Delta csrB$ $\Delta csrC$ y $\Delta sirA$

Proteína	p-value	$\Delta csrB$ $\Delta csrC$ WT ^a	p-value	$\Delta sirA$ WT ^a	p-value	$\Delta sirA$ $\Delta csrB$ $\Delta csrC$ ^a	Proceso biológico	Presente en <i>E. coli</i> K-12	Conectado previamente con CsrA ^b
Otras de virulencia									
SrfB	0.0011	1.8	0.019	2	0.54	1.1	probable proteína efectora	No	-
Movilidad									
FigL	0.013	INF	0.029	INF	0.4	1.5	movilidad celular	Si (FlaT)	sCo-IP1, sMic, eMic
CheZ	0.00036	2.1	0.026	2.1	0.97	1	quimiotaxis	Si	sMic
FigN	0.0041	2.6	0.031	2.6	0.92	1	ensamblaje del flagelo	Si	eMic, sMic
FliT	0.017	4.4	0.049	3.6	0.48	0.8	ensamblaje del flagelo	Si	eMic, sMic
FliG	0.25	9.2	0.016	10	0.59	1.4	ensamblaje del flagelo	Si	eMic
YcgR	0.085	INF	< 0.00010	INF	0.89	1.1	ensamblaje del flagelo	Si	-
CheM	0.012	2.2	0.13	2	0.74	0.9	quimiotaxis	No	sCo-IP1
Tsr	0.038	3	0.39	1.5	0.16	0.5	quimiotaxis	Si	sMic
Aer	0.00031	INF	0.16	INF	0.23	0.5	quimiotaxis	Si	eCo-IP1, eMic
SL3126	0.0019	INF	0.13	INF	0.35	0.6	quimiotaxis	No	sCo-IP2
FigK	0.027	12	0.068	10	0.55	0.8	ensamblaje del flagelo	Si	eMic, ePred2
Trg	0.0026	INF	0.13	INF	0.023	0.3	quimiotaxis	Si	-
Metabolismo									
SL4396	0.012	4.7	0.012	4.1	0.53	0.9	metabolismo de carbono y aminoácidos	No	-
TdcG	0.002	5	0.045	4.3	0.55	0.9	metabolismo de carbono y aminoácidos	Si	-
ThrA	0.008	2.3	0.037	2.2	0.97	1	metabolismo de aminoácidos	Si	eCo-IP2, eCo-IP3
HutU	0.00098	3.7	0.017	3	0.31	0.8	metabolismo de aminoácidos	No	-
SL4393	0.022	INF	< 0.00010	INF	0.11	0.4	metabolismo de aminoácidos	Si (ArgR)	eCo-IP2, eCo-IP3
MglA	0.023	5.5	0.034	4.8	0.69	0.9	transporte de carbohidratos	Si	eMic
MalT	0.0005	2.4	0.04	2	0.14	0.8	metabolismo de carbono	Si	sCo-IP1, eCo-IP1, eCo-IP2, sCo-IP2, eCo-IP3
TdcE	0.0015	2.4	0.035	2.5	0.74	1.1	metabolismo de carbono	Si	eCo-IP1
AphA	0.008	2.6	0.021	2.1	0.13	0.8	metabolismo de carbono	Si	ePred2, eCo-IP2
CelF	0.0091	2.9	0.011	2.3	0.11	0.8	metabolismo de carbono	Si	ePred2
MeIA	0.0084	4.1	0.0086	4.6	0.55	1.3	metabolismo de carbono	Si	eCo-IP3
YjfQ	0.041	5	0.033	3.4	0.49	0.8	metabolismo de carbono	Si (UlaR)	eMic
SL4470	0.00078	7.5	0.018	8.6	0.72	1.1	metabolismo de carbono	No	-
CbiG	0.00057	9.3	0.023	5.4	0.047	0.6	metabolismo de cofactores y vitaminas	No	sMic
CysQ	0.0032	2.4	0.013	2.4	0.95	1	procesos de óxido-reducción	Si	eCo-IP1, eCo-IP3
SL1071	0.0049	2.7	0.018	2.8	0.53	1.1	procesos de óxido-reducción	No	-

AsrB	0.027	4.6	0.0033	5.3	0.45	1.2	procesos de óxido-reducción	No	-
PduD	0.0084	2.3	0.015	2.2	0.88	1	metabolismo de propanediol	No	sPred1
PduE	0.00059	2.3	0.00031	2	0.15	0.9	metabolismo de propanediol	No	sRNA
PduP	0.0038	4.9	0.00012	5.3	0.37	1.1	metabolismo de propanediol	No	-
PduQ	0.01	7.2	0.0089	5.9	0.3	0.8	metabolismo de propanediol	No	-
PduS	< 0.00010	INF	0.0047	INF	0.13	0.8	metabolismo de propanediol	No	-
AstA	0.15	3.8	0.02	4.2	0.79	1.1	metabolismo de aminoácidos	Si	sCo-IP1
FadR	0.061	3.3	0.032	2.8	0.42	0.8	metabolismo de lípidos	Si	ePred2, eMic, eCo-IP3
DadA	0.039	2.7	0.47	1.9	0.47	0.7	metabolismo de aminoácidos	Si	sCo-IP1, eMic, eCo-IP3
HutH	0.019	6.1	0.083	2.9	0.08	0.5	metabolismo de aminoácidos	No	-
SL2313	0.022	2.3	0.46	1.5	0.27	0.7	metabolismo de carbono	No	-
GloA	0.0018	2.6	0.046	1.6	0.0084	0.6	metabolismo de carbono	Si	eCo-IP3
SdhB	0.0018	2.6	0.12	1.8	0.059	0.7	metabolismo de carbono	Si	eProtA, eProtB
Fucl	0.0025	4.2	0.082	2.5	0.12	0.6	metabolismo de carbono	Si	-
DacA	0.013	INF	0.37	INF	0.42	0.5	biogénesis de la pared celular	Si	eMic
LpxA	0.0092	2	0.67	1.2	0.19	0.7	metabolismo de lípidos	Si	eCo-IP3
GlpF	0.034	3.1	0.55	1.6	0.18	0.5	metabolismo de lípidos	Si	sCo-IP1, eMic, eCo-IP2, sCo-IP3, eCo-IP3
Cfa	0.0051	INF	0.37	INF	0.16	0.3	metabolismo de lípidos	Si	sCo-IP1, eMic, eCo-IP3
HemN	0.034	2	0.74	1.1	0.11	0.6	metabolismo de cofactores y vitaminas	Si	eMic
YhhK	0.037	5.2	0.92	1.2	0.055	0.2	metabolismo de cofactores y vitaminas	Si (PanZ, PanM)	eCo-IP2
CbiC	0.0046	5.6	0.14	4.3	0.93	1	metabolismo de cofactores y vitaminas	No	sMic
YdgJ	0.0054	2.1	0.012	1.9	0.33	0.8	procesos de óxido-reducción	Si	-
DmsA	0.018	2.2	0.14	1.6	0.17	0.7	procesos de óxido-reducción	Si	eCo-IP1
AsrC	0.0099	2.7	0.6	1.4	0.077	0.5	procesos de óxido-reducción	No	-
DmsB	0.011	6.9	0.41	2.8	0.11	0.4	procesos de óxido-reducción	Si	ePred2
DhaB	0.0038	2.1	0.0086	1.9	0.42	0.9	metabolismo de propanediol	No	-
PduA	0.037	3.1	0.18	3	0.98	1	metabolismo de propanediol	No	sMic, sRNA
PocR	0.0027	INF	0.12	INF	0.25	0.6	metabolismo de propanediol	No	-
FdoG	0.043	2	0.48	0.7	0.0089	0.4	procesos de óxido-reducción	Si	sPred2, eCo-IP1, eMic, eCo-IP3
SL2944	0.0004	2.7	0.046	1.3	0.0016	0.5	procesos de óxido-reducción	Si (YqcA)	eProtA, ePred1, ePred2, eMic
Otras funciones									
Rnc	0.014	10	0.048	4.9	0.011	0.4	procesamiento del RNA	Si	eCo-IP3
Tgt	0.018	INF	0.0057	INF	0.58	1.2	modificación del RNA	Si	-

SogL	0.13	INF	0.032	INF	0.78	1.2	replicación del DNA	No	-
FtsH	0.31	3.3	0.015	3.1	0.77	0.8	Metabolismo de proteínas	Si	sCo-IP1, eCo-IP1, eCo-IP3
TrmJ	0.083	2.7	0.032	3.6	0.28	1.4	modificación del RNA	Si	eMic
Rpl32	0.25	1.5	0.031	3	0.073	1.7	traducción	Si (RpmF)	eCo-IP3
Ssb	0.038	2.2	0.53	1.4	0.35	0.7	recombinación del DNA	Si	eProtB, eMic, eCo-IP2, sCo-IP2, eCo-IP3
ModA	0.0007	2.3	0.0036	1.8	0.032	0.8	actividad de transportador	Si	eCo-IP1
ZnuA	0.049	4	0.1	2.5	0.33	0.7	actividad de transportador	Si	eCo-IP3
YihI	0.00052	24	0.59	1.7	0.00095	0.06	biogénesis del ribosoma	Si	eCo-IP1, eMic, eCo-IP3
YqcB	0.014	INF	1	INF	0.012	0	modificación del RNA	Si (TruC)	eProtA, eCo-IP1, eMic
RhlB	0.05	2.4	0.83	0.9	0.022	0.4	procesamiento del RNA	Si	eMic, sCo-IP2, eCo-IP3
YrbD	0.022	4.6	0.98	1	0.025	0.2	actividad de transportador	Si (MlaD)	-
Función desconocida									
YgfB	0.77	1.2	0.021	2.1	0.3	1.4	función desconocida	Si	eCo-IP1, eMic, eCo-IP3
YifE	0.0034	3.3	0.18	1.8	0.028	0.5	función desconocida	Si	eCo-IP3
YcgL	0.043	5.1	0.4	2.6	0.18	0.5	función desconocida	Si	eCo-IP3, eMic
SL1061	0.011	6.2	0.32	3.1	0.14	0.5	función desconocida	No	-
YhcB	0.036	INF	0.16	INF	0.19	0.4	función desconocida	Si	eProtA, sPred1, eProtB, eMic, eCo-IP3
YegQ	0.0014	INF	0.12	INF	0.25	0.6	función desconocida	Si	-
SL1969	0.027	INF	0.37	INF	0.2	0.3	función desconocida	YfdQ?	eMic?
SLP2_0011	0.038	2.1	0.24	0.6	0.0056	0.3	función desconocida	No	-
YqcC	0.0037	3.2	0.45	0.7	0.00017	0.2	función desconocida	Si	eProtA, sCo-IP1, eCo-IP1, eMic, eCo-IP3

^a **INF**: División entre cero, es decir que no se expresa la cepa del denominador (WT ó $\Delta csrB \Delta csrC$)

^b **Abreviaturas:**

eProtA: Proteómica en cepa *csrA51* y $\Delta csrB \Delta csrC$ en *E. coli* K-12 (Sowa et al., 2017)
sCo-IP1: Co-Imunoprecipitación con CsrA-3XFLAG en *S. Typhimurium* SL1344 (Holmqvist et al., 2016)
ePred1: Predicción bioinformática de sitios de unión de CsrA en *E. coli* K-12 (Kulkarni et al., 2014)
sPred1: Predicción bioinformática de sitios de unión de CsrA en *S. Typhimurium* LT2 (Kulkarni et al., 2014)
eProtB: Proteómica sobre-expresando a CsrB en *E. coli* K-12 (McKee et al., 2012)
ePred2: Predicción bioinformática de sitios de unión de CsrA en *E. coli* K-12 (McKee et al., 2012)
eCo-IP1: Co-Imunoprecipitación con CsrA-His6 en *E. coli* K-12 (Edwards et al., 2011)
eMic: Microarreglos en cepa *csrA51* en *E. coli* K-12 (Esquerré et al., 2016)
eCo-IP2: Co-Imunoprecipitación de UvrY-FLAG en *E. coli* K-12 (Zere et al., 2015)
sCo-IP2: Co-Imunoprecipitación de SirA-FLAG en *S. Typhimurium* 14028S (Zere et al., 2015)
sMic: Microarreglos en cepa $\Delta csrA$ en *S. Typhimurium* 14028S (Lawhon et al., 2003)
sRNA: RNAseq en cepa $\Delta barA/sirA^{-432}$ en *S. Typhimurium* 4/74 (Colgan et al., 2016)
eCo-IP3: HITS-CLIP con CsrA-FLAG en *E. coli* K12 (Sowa et al., 2017)

Proteínas expresadas diferencialmente (25) en las cepas mutantes $\Delta csrB$ $\Delta csrC$ y $\Delta sirA$

Proteína	p-value	$\Delta csrB$ $\Delta csrC/WT$ ^a	p-value	$\Delta sirA/WT$ ^a	p-value	$\Delta sirA/\Delta csrB$ $\Delta csrC$ ^a	Proceso biológico	Presente en <i>E. coli</i> K-12	Conectado previamente con CsrA ^b
Relacionados a SPI-1									
InvB	0.0005	0.2	0.0025	0.5	0.00039	2.1	chaperona	No	sCo-IP1, sMic, sRNA
PrgI-SipD	0.00033	0.2	0.00081	0.5	0.0034	2.3	sistema de secreción	No	sCo-IP1, sMic, sRNA
SptP	< 0.00010	0.03	< 0.00010	0.2	0.0089	5.8	proteína efectora	No	sPred1, sMic, sRNA
Otros de virulencia									
SirA	0.063	3.4	0.26	0	0.0045	0	transcription regulation	Si UvrY	eProtA, eCo-IP3
Movilidad									
Trg	0.0026	INF	0.13	INF	0.023	0.3	quimiotaxis	Si	-
Metabolismo									
TrpA	0.016	0.3	0.14	0.8	0.019	2.9	metabolismo de aminoácidos	Si	eMic, eCo-IP3
FdoG	0.043	2	0.48	0.7	0.0089	0.4	procesos de óxido-reducción	Si	sPred2, eCo-IP1, eMic, eCo-IP3
SL2944	0.0004	2.7	0.046	1.3	0.0016	0.5	procesos de óxido-reducción	Si (YqcA)	eProtA, ePred1, ePred2, eMic
AroH	0.36	1.4	0.42	0.7	0.046	0.5	metabolismo de aminoácidos	Si	eMic, eCo-IP3
CbiP	0.002	0.6	0.15	1.4	0.023	2.3	metabolismo de cofactores y vitaminas	No	sCo-IP1, sMic
Otras funciones									
DdIB	0.44	1.3	0.35	0.7	0.011	0.5	biogénesis de la pared celular	Si	sPred1, eCo-IP1, eMic, eCo-IP3
DkgB	0.24	0.2	0.43	1.5	0.01	6.7	procesos de óxido-reducción	Si	-
YihI	0.00052	24	0.59	1.7	0.00095	0.06	biogénesis del ribosoma	Si	eCo-IP1, eMic, eCo-IP3
YqcB	0.014	INF	1	INF	0.012	0	modificación del RNA	Si (TruC)	eProtA, eCo-IP1, eMic
RhIB	0.05	2.4	0.83	0.9	0.022	0.4	procesamiento del RNA	Si	eMic, sCo-IP2, eCo-IP3
YrbD	0.022	4.6	0.98	1	0.025	0.2	actividad de transportador	Si (MlaD)	-
NuoA	0.058	4.1	0.53	0.5	0.017	0	fosforilación oxidativa	Si	eCo-IP3
RepA2	0.7	1.2	0.13	0	< 0.00010	0	replicación del DNA	No	-
TruA	0.13	2.7	0.37	0.3	0.037	0.1	modificación del RNA	Si	eCo-IP1, eCo-IP3
YbaX	0.32	1.8	0.17	0	0.017	0	modificación del RNA	Si (QueC)	-
YeiP	0.32	1.8	0.5	0.5	0.013	0.2	traducción	Si	eCo-IP1
Función desconocida									
EiaA	0.017	0.3	0.87	1	0.031	3.4	función desconocida	Si	ePred2
YdiH	0.0002	0.4	0.36	1.3	0.039	3.9	función desconocida	Si	eMic, eCo-IP3
SLP2_0011	0.038	2.1	0.24	0.6	0.0056	0.3	función desconocida	No	-
YqcC	0.0037	3.2	0.45	0.7	0.00017	0.2	función desconocida	Si	eProtA, sCo-IP1, eCo-IP1, eMic, eCo-IP3

^a INF: División entre cero, es decir que no se expresa la cepa del denominador (WT ó $\Delta csrB \Delta csrC$)

^b Abreviaturas:

eProtA: Proteómica en cepa *csrA51* y $\Delta csrB \Delta csrC$ en *E. coli* K-12 (Sowa et al., 2017)

sCo-IP1: Co-Imunoprecipitación con CsrA-3XFLAG en *S. Typhimurium* SL1344 (Holmqvist et al., 2016)

ePred1: Predicción bioinformática de sitios de unión de CsrA en *E. coli* K-12 (Kulkarni et al., 2014)

sPred1: Predicción bioinformática de sitios de unión de CsrA en *S. Typhimurium* LT2 (Kulkarni et al., 2014)

eProtB: Proteómica sobre-expresando a CsrB en *E. coli* K-12 (McKee et al., 2012)

ePred2: Predicción bioinformática de sitios de unión de CsrA en *E. coli* K-12 (McKee et al., 2012)

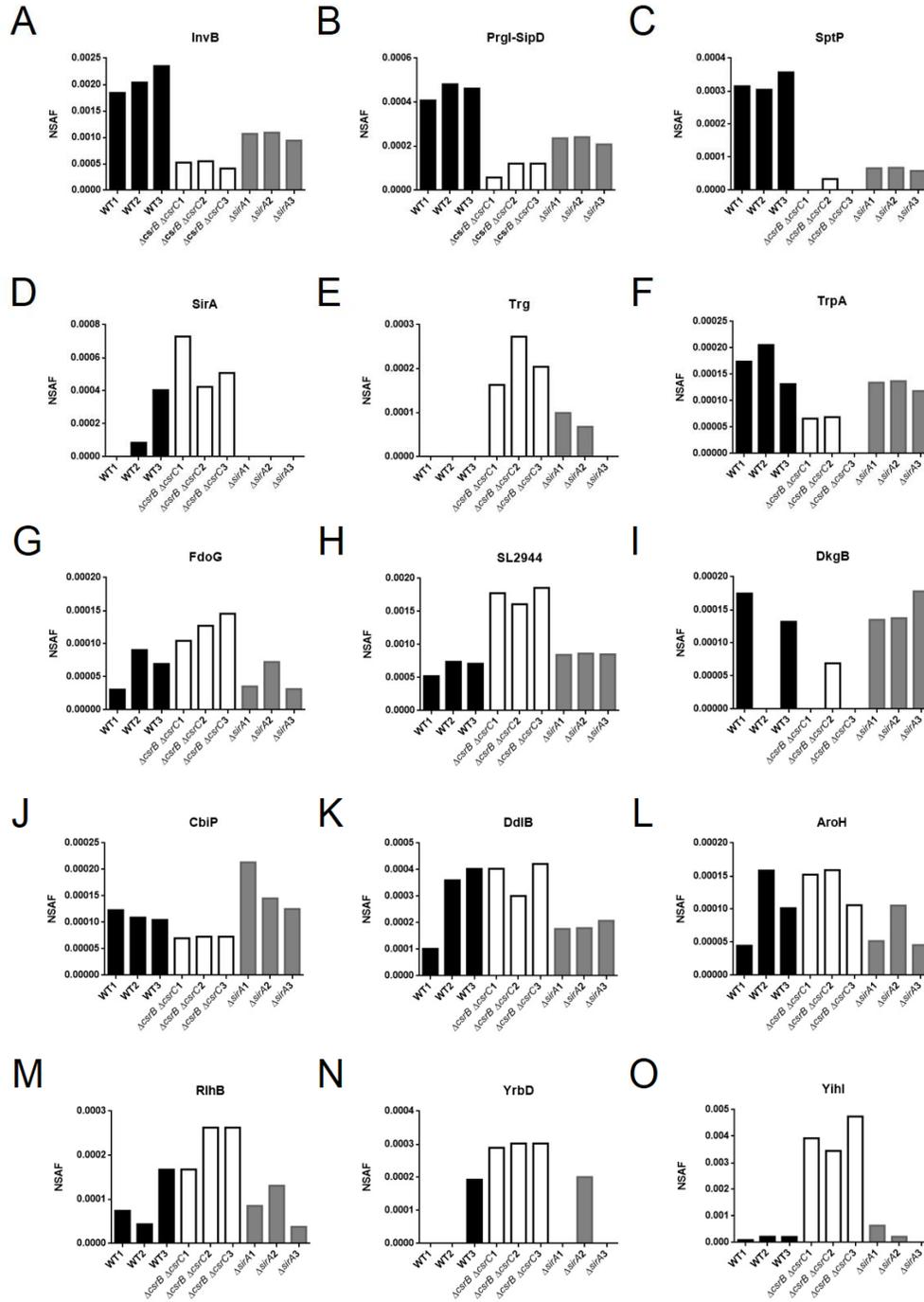
eCo-IP1: Co-Imunoprecipitación con CsrA-His6 en *E. coli* K-12 (Edwards et al., 2011)

eMic: Microarreglos en cepa *csrA51* en *E. coli* K-12 (Esquerré et al., 2016)

eCo-IP2: Co-Imunoprecipitación de UvrY-FLAG en *E. coli* K-12 (Zere et al., 2015)

sCo-IP2: Co-Immunoprecipitación de SirA-FLAG en *S. Typhimurium* 14028S (**Zere et al., 2015**)
sMic: Microarreglos en cepa $\Delta csrA$ en *S. Typhimurium* 14028S (**Lawhon et al., 2003**)
sRNA: RNAseq en cepa $\Delta barA/sirA^{432}$ en *S. Typhimurium* 4/74 (**Colgan et al., 2016**)
eCo-IP3: HITS-CLIP con CsrA-FLAG en *E. coli* K12 (**Sowa et al., 2017**)

ANEXO 2: Gráficas de las proteínas expresadas diferencialmente en las cepas $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$



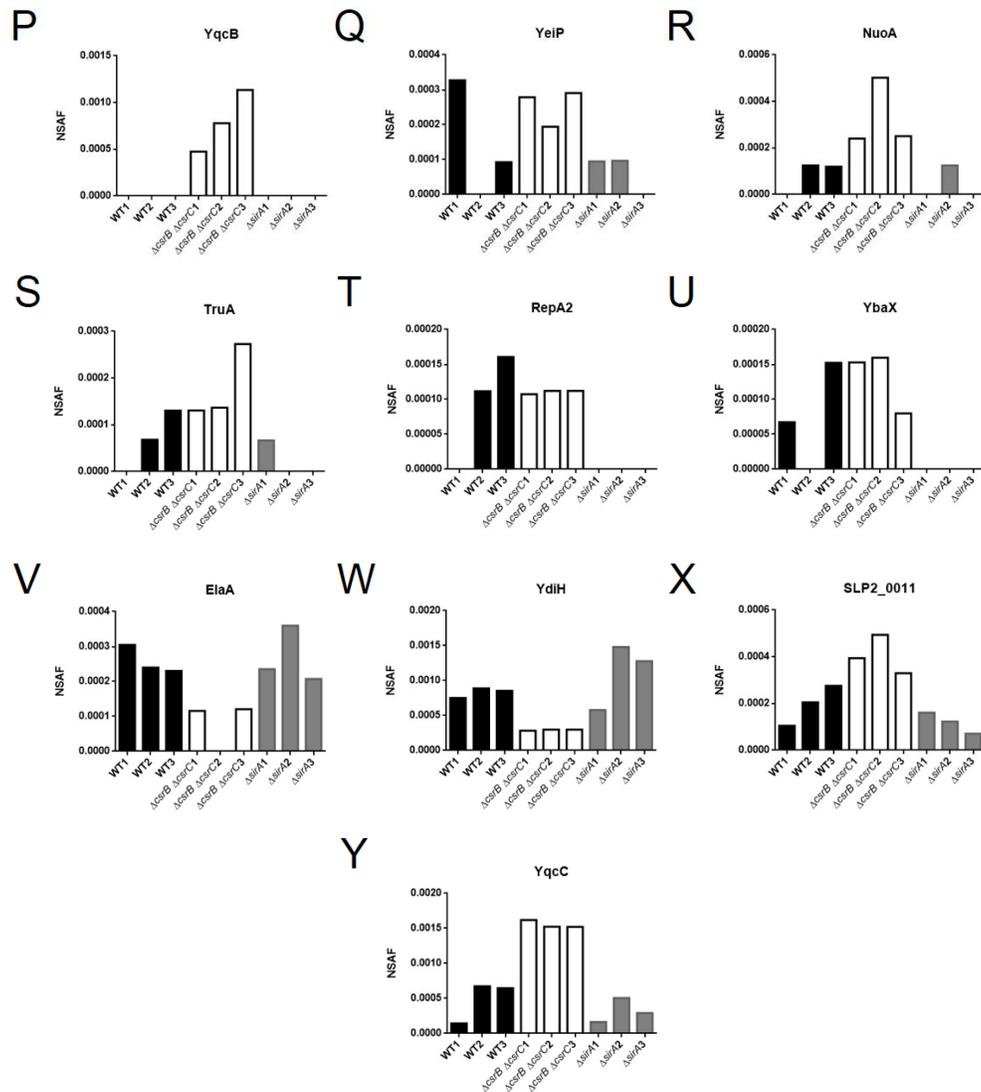


Figura I. Cuantificación relativa de la expresión de las proteínas expresadas diferencialmente en las cepas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$. Factor de abundancia espectral normalizado (NSAF) de la expresión de proteínas relacionadas a SPI-1 (A-C), virulencia (D), movilidad (E), metabolismo (F-L), otras funciones (M-U) y función desconocida (V-Y), a partir de los datos proteómicos obtenidos por LC-MS/MS en las cepas de *S. Typhimurium* WT, $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$. En las gráficas se muestran los valores de las tres réplicas de cada cepa.

ANEXO 3: Mapa de calor de las proteínas obtenidas en este estudio

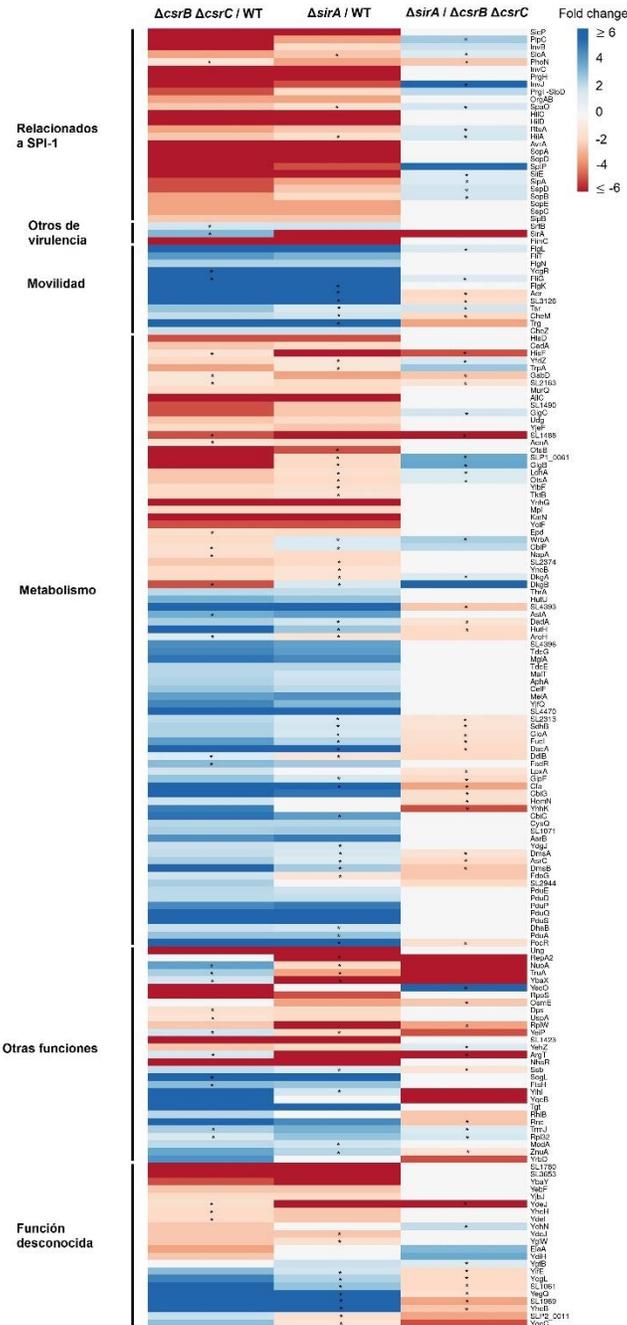


Figura II. Clasificación de las proteínas expresadas diferencialmente en las distintas cepas *S. Typhimurium*. Mapa de calor que muestra el número de veces que cambio la expresión (fold change) de las proteínas obtenidas en las cepas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, con respecto a la cepa WT o en la mutante $\Delta sirA$, con respecto a la mutante $\Delta csrB \Delta csrC$. Se muestra las categorías funcionales de las proteínas relacionadas a SPI-1, otras proteínas de virulencia, involucradas en la movilidad, en el metabolismo, otras funciones y con función desconocida, obtenidas con las bases de datos del NCBI, Uniprot, KEEG y STRING. *, muestra aquellas proteínas que no entraron dentro de nuestros criterios de selección debido a una relación < 2 ó > -2 o bien, no fueron estadísticamente significativas debido a una $p > 0.05$ (Comparar con la Figura 7).

ANEXO 4: Medios y soluciones

Medio LB

Para 1L: 10g de bacto triptona, 5g de extracto de levadura, 10g de NaCl, 900 ml de Agua destilada. Disolver bien y aforar a 1 litro con agua Mili Q. Esterilizar por autoclave a 121°C y 15 psi durante 15-20 min. Para preparar medio LB sólido, agregar 15 g de bacto agar.

Medio SOB

Para 500 ml: 10 g Bacto triptona, 2.5 g extracto de levadura, 0.25 g NaCl, 1.25 ml de KCl 1M. Aforar a 500 ml con agua Mili Q. Esterilizar por autoclave a 121°C y 15 psi durante 15-20 min.

Medio SOC

Para 100 ml: 2 g Bacto triptona, 0.5 g de extracto de levadura, 0.2 ml de NaCl 5M, 0.25 ml de KCl 1M, 1 ml de MgCl₂ 1M, 1 ml de MgSO₄ 1M, 0.36 g de Glucosa. Aforar a 100ml con agua Mili Q. Esterilizar por autoclave a 121°C y 15 psi durante 15-20 min.

Buffer SET

Para 500ml: Pesar 100 g de sacarosa, agregar 200 ml de agua Mili Q, 50ml del de EDTA 0.5M pH 8 y 12.5 ml de Tris 1M pH 8, aforar a 500 ml con agua Mili Q. Esterilizar por autoclave a 121°C y 15 psi durante 15-20 min.

TAE 50X

Para 1L: Pesar 242 g de Tris Base, disolver en 500ml de agua Mili Q, agregar 100ml de EDTA 0.5M pH 8 y 57.1 ml de ácido acético glacial, aforar a 1L con agua mili Q y filtrar con filtros de 0.44µ.

PBS 10X pH 7.4

Para 1L: Pesar 80 g de NaCl, 6.1 g de Na₂HPO₄, 2 g de KH₂PO₄ y 2 g de KCl, disolver en 500 ml de agua Mili Q, ajustar el pH, aforar a 1L. Esterilizar por autoclave a 121°C y 15 psi durante 15-20 min.

Tris-HCl/SDS pH 6.8

Para 100ml: Pesar 6.05 g de Tris base, disolver en 50 ml de agua Mili Q y ajustar el pH a 6.8 con HCl. Entonces, se agregan 0.4 g de SDS, se afora a 100ml y se filtra con filtros de 0.44µ.

Tris-HCl/SDS pH 8.8

Para 100ml: Pesar 18.2 g de Tris base, disolver en 50 ml de agua Mili Q y ajustar el pH a 8.8 con HCl. Entonces, se agregan 0.4g de SDS, se afora a 100 ml y se filtra.

Buffer de corrida 4X para proteínas

Para 1L: Pesar 12 g de Tris base, 57.6 g de glicina y 4 g de SDS, disolver en 500 ml de agua Mili Q, aforar a 1L y filtrar con filtros de 0.44 μ .

Buffer de transferencia para Western blot

Para 1L: Pesar 5.82 g de Tris base, 2.93 g de glicina, 1.875 ml de SDS 20%, disolver en 500 ml de agua Mili Q, agregar 200ml de metanol, aforar a 1L y filtrar con filtros de 0.44 μ .

PBST

Para 1L: Mezclar 100 ml de PBS 10X pH 7.4, 3 ml de Tween-20 y aforar a 1L con agua Mili Q.

Solución bloqueadora para Western blot

Mezclar 0.5 g de leche sin grasa en 10 ml de buffer PBST

Azul de coomassie R250

Para 1L: Pesar 0.55 g de Coomassie Brilliant Blue R250, disolver en 500 ml de agua Mili Q, 100 ml de ácido acético glacial y 500 ml de metanol. Agitar con mosca durante toda la noche y filtrar con papel Whatman.

Buffer de carga de DNA 5X

Mezclar 125 mg azul de bromofenol, 125 mg xylene cyanol FF, 25 ml glicerol y 25 ml agua Mili Q

Buffer de carga de proteínas 4X

Para 320 ml: Mezclar 10 ml de Tris-HCl 2M pH 7.5, 64 ml de Glicerol al 100%, 32 ml de SDS al 20%, 16 ml de 0.5% azul de bromofenol y aforar a 320 ml con agua Mili Q.

DTT

Para 200 ml: mezclar 10 ml de Tris-HCl 1M pH 7.8 con 6 μ l de DTT 1M, aforar a 200 ml con agua Mili Q.

Buffer Z 5X

Para 1L: mezclar 42.58g de Na_2HPO_4 , 27.6g de NaH_2PO_4 , 3.8 de KCl, 1.22 de MgSO_4 , ajustar el pH a 7, aforar a 1L y filtrar con filtro de 0.22 μ .

Medio E 50X

Para 50ml: Mezclar 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g de ácido cítrico, 25 g de K_2HPO_4 anhidrido y 8.75g de $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Esterilizar por autoclave a 121°C y 15 psi durante 15-20 min.

Medio P22

Para 100 ml: mezclar 2 ml de medio E 50X, 1 ml de glucosa al 20% y 1 ml de fago P22.

REFERENCIAS

1. Adamson D. N., Lim H. N. (2013). Rapid and robust signaling in the CsrA cascade via RNA-protein interactions and feedback regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(32): 13120-5
2. Altier C., Suyemoto M., Ruiz, A. I., Burnham K. D., & Maurer R. (2000a). Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Mol Microbiol*. 35(3): 635-46
3. Altier C., Suyemoto M., Lawhon S. D. (2000b). Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion genes by *csrA*. *Infect Immun*. 68(12): 6790-97
4. Baxter M. A., Fahlen T. F., Wilson R. L., 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(3): 1295-305
5. Bäumlér A. J., Tsolis R. M., Bowe F. A., Kusters J. G., Hoffmann S., Heffron F. (1996). The *pef* fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect Immun*. 64(1): 61-8
6. Brenner F. W., Villar R. G., Angulo F. J., Tauxe R., Swaminathan B. (2000). *Salmonella* Nomenclature. *J Clin Microbiol*. 38(7): 2465-67
7. Bustamante V. H., Martínez L. C., Santana F. J., Knodler L. A., Steele-Mortimer O., Puente J. L. (2008). HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(38): 14591-96
8. Burkinshaw B. J., & Strynadka N. C. J. (2014). Assembly and structure of the T3SS. *Biochem Biophys Acta*. 1843(8): 1649-63
9. Camacho M. I., Alvarez A. F., Chavez R. G., Romeo T., Merino E., Georgellis D. (2015). Effects of the global regulator CsrA on the BarA/UvrY two-component signaling system. *J Bacteriol*. 197(5): 983-91
10. Castañeda M., López-Pliego L., Espín G. (2016) *Azotobacter vinelandii* small RNAs: their roles in the formation of cysts and other processes. In: Leitão A., Enguita F. (eds) Non-coding RNAs and Inter-kingdom Communication. Springer, Cham
11. Chavez R. G., Alvarez A. F., Romeo T., & Georgellis D. (2010). The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J Bacteriol*. 192(7): 2009-12
12. Chilcott G. S., Hughes K. T. (2000). Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 64(4): 694-708
13. Choi K. H., Gaynor J. B., White K. G., Lopez C., Bosio C. M., Karkhoff-Schweizer R. R., Schweizer H. P. (2005). A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat Methods*. 2(6): 443-8

14. Crump J. A., Luby S. P., & Mintz E. D. (2004). The global burden of typhoid fever. *B World Health Organ.* 82(5): 346-53
15. Colgan A. M., Kröger C., Diard M., Hardt W. D., Puente J. L., Sivasankaran S. K., Hokamp K., Hinton J. C. D. (2016). The impact of 18 ancestral and horizontally-acquired regulatory proteins upon the transcriptome and sRNA landscape of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS Genet.* 12(8): e1006258
16. Datsenko K. A. & Wanner B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(12): 6640-45
17. Deutscher J., Désirée M., Derkaoui M., Zébré C., Cao N. (2014). The bacterial phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system: Regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions. *Microbiol Mol Biol R.* 78(2): 231-56
18. Diard M. & Hardt W. D. (2017). A basic processes in *Salmonella*-host interactions: within-host evolution and the transmission of the virulent genotype. *Microbiol Spectrum.* 5(5): MTBP-0012-2016.
19. Dong T. & Schellhorn H. E. (2009). Control of RpoS in global gene expression of *Escherichia coli* in minimal media. *Mol Genet Genomics.* 281(1):19-33
20. Dubey A. K., Baker C. S., Romeo T., Babitzke P. (2005). RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA–RNA interaction. *RNA.* 11(10): 1579-87
21. Edwards A. N., Patterson-Fortin, L. M., Vakulskas C. A., Mercante J. W., Potrykus K., Vinella D., Camacho M. I., Fields J. A., Thompson S. A., Georgellis D., Cashel M., Babitzke P., Romeo, T. (2011). Circuitry linking the Csr and stringent response global regulatory systems. *Mol Microbiol.* 80(6): 1561-80
22. Esquerré T., Bouvier M., Turlan C., Carpousis A.J., Girbal L., Coccagn-Bousquet M. (2016). The Csr system regulates genome-wide mRNA stability and transcription and thus gene expression in *Escherichia coli*. *Nature Sci Rep.* 6: 25057
23. Fàbrega A. & Vila J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev.* 26(2): 308-41
24. Fass E. & Groisman E. A. (2009). Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol.* 12(2):199-204
25. Frye J., Karlinsey J. E., Felise H. R., Marzolf B., Dowidar N., McClelland M., Hughes K. T. (2006). Identification of new flagellar genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* 188(6): 2233-43
26. Fookes M., Schroeder G. N., Langridge G. C., Blondel C. J., Mammina C., Connor T. R., Seth-Smith H., Vernikos G. S., Robinson K. S., Sanders M., Petty N. K., Kingsley R. A., Bäumlner A. J., Nuccio S-P., Contreras I., Santiviago C. A., Maskell D., Barrow P., Humphrey T., Nastasi A., Roberts M., Frankel G., Parkhill

- J., Dougan G., Thompson N. R. (2011). *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the Salmonellae. *PLoS Pathog.* 7(8): e1002191
27. Forshell L. P., Wierup M. (2006). *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev Sci Tech OIE.* 25(2): 541-54
28. Fortune D. R., Suyemoto M., Altier C. (2006) Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun.* 74(1): 331-339
29. García-Calderón C. B., Casadesús J, Ramos-Morales F. (2007). Rcs and PhoPQ regulatory overlap in the control of *Salmonella enterica* virulence. *J Bacteriol.* 189(18): 6635-44
30. Giammanco G. M., Pignato S., Mammina C., Grimont F., Grimont P. A. D., Nastasi A., Giammanco G. (2002). Persistent endemicity of *Salmonella bongori* 48:z35:- in Southern Italy: Molecular characterization of human, animal, and environmental isolates. *J Clin Microbiol.* 40(9): 3502-05
31. Goodier R. I. & Ahmer B. M. M. (2001). SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol.* 183(7): 2249-58
32. Gudapaty S., Suzuki K., Wang X., Babitzke P., Romeo T. (2001). Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 183(20): 6017-27
33. Gutiérrez P., Li Y., Osborne M. J., Pomerantseva E., Liu Q., Gehring K. (2005). Solution structure of the carbon storage regulator protein CsrA from *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 187(10): 3496-501
34. Haraga A., Ohlson M. B., Miller S. I. (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nature Rev Microbiol.* 6(1): 53-66
35. Hoiseth S. K. & Stocker B. A. (1981). Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature.* 291(5812): 238-39
36. Holmqvist E., Wright P. R., Li L., Bischler T., Barquist L., Reinhardt R., Backofen R., Vogel J. (2016). Global RNA recognition patterns of post-transcriptional regulators Hfq and CsrA revealed by UV crosslinking *in vivo*. *EMBO J.* 35(9): 991-1011
37. Hung C. C., Garner C. D., Slauch J. M., Dwyer Z. W., Lawhon S. D., Frye J. G., McClelland M., Ahmer B. M. M., Altier C. (2013). The intestinal fatty acid propionate inhibits *Salmonella* invasion through the post-translational control of HilD. *Mol Microbiol.* 87(5): 1045-60
38. Ilyas B., Tsai C. N., Coombes B. K. (2017). Evolution of *Salmonella*-host cell interactions through a dynamic bacterial genome. *Front Cell Infect Microbiol.* 7(428): 1-15
39. Johnston C., Pegues D. A., Christoph J., Lee C. A., Miller S. I., Health B., Building S. (1996). Transcriptional activation of *Salmonella* Typhimurium

- invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily. *Mol Microbiol.* 22(4): 715–27.
40. Jonas K., Edwards A. N., Ahmad I., Romeo T., Römling U., Melefors Ö. (2010). Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella* Typhimurium. *Environ Microbiol.* 12(2): 524-40
 41. Kay E., Dubuis C., Haas D. (2005). Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(47): 17136-41
 42. Khan M. I., Katrinak C., Freeman A., Franco-Paredes C. (2016). Enteric fever and invasive nontyphoidal salmonellosis-9th International conference on typhoid and invasive NTS disease, Bali, Indonesia, April 30–May 3, 2015. *Emerg Infect Dis.* 22(4): e151463
 43. Kukkonen M., Raunio T., Virkola R., Lähteenmäki K., Mäkelä P. H., Klemm P., Clegg S., Korhonen T. K. (1993). Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type I fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin. *Mol Microbiol.* 7(2): 229-37
 44. Kulkarni R. P., Jia T., Kuehne S. A., Kerkering T. M., Morris E. R., Searle M. S., Heeb S., Rao J., Kulkarni R. V. (2014). A sequence-based approach for prediction of CsrA/RsmA targets in bacteria with experimental validation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* 42(11): 6811-25
 45. Lawhon S. D., Maurer R., Suyemoto M., & Altier C. (2002). Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella* Typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol.* 46(5): 1451-64.
 46. Lawhon S. D., Frye J. G., Suyemoto M., Porwollik S., McClelland M., Altier C. (2003). Global regulation by CsrA in *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol.* 46(6): 1633-45
 47. Leng Y., Vakulskas C. A., Zere T. R., Pickering B. S., Watnick P. I., Babitzke P., Romeo T. (2016). Regulation of CsrB/C sRNA decay by EIIA^{Glc} of the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Mol Microbiol.* 99(4): 627-39
 48. Liu M. Y., Yang H., Romeo T. (1995). The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J Bacteriol.* 177(10): 2663-72
 49. Liu M. Y., Gui G., Wei B., Preston J. F., Oakford L., Yüksel Ü., Giedroc D. P., Romeo T. (1997). The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 272(28): 17502-10
 50. Manzo J., Cocotl-Yañez M., Tzontecomani T., Martínez V. M., Bustillos R., Velásquez C., Goiz Y., Solís Y., López L., Fuentes L. E., Nuñez C., Segura D., Espín G., Castañeda M. (2011). Post-transcriptional regulation of the alginate

- biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 21(1): 147-59
51. Majowicz S. E., Musto J., Scallan E., Angulo F. J., Kirk M., Brien S. J. O., Jones T. F., Fazil A., Hoekstra R. M. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis.* 50: 882–89
 52. Martínez L. C., Yakhnin H., Camacho M. I., Georgellis D., Babitzke P., Puente J. L., Bustamante V. H. (2011). Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Mol Microbiol.* 80(6): 1637-56
 53. Martínez L. C., Martínez-Flores I., Salgado H., Fernández-Mora M., Medina-Rivera A., Puente J. L., Collado-Vides J., Bustamante V. H. (2014). *In silico* identification and experimental characterization of regulatory elements controlling the expression of the *Salmonella* *csrB* and *csrC* genes. *J Bacteriol.* 196(2): 325-36
 54. Martínez-Flores I., Pérez-Morales D., Sánchez-Pérez M., Paredes C. C., Collado-Vides J., Salgado H., Bustamante V. H. (2016). *In silico* clustering of *Salmonella* global gene expression data reveals novel genes co-regulated with the SPI-1 virulence genes through HilD. *Nature Sci Rep.* 6: 37858
 55. Mayer M. P. (1995). A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene.* 163(1): 41-6
 56. Metsalu T & Vilo J. (2015). ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* 43(W1): W566-70
 57. McKee A. E., Rutherford B. J., Chivian D. C., Baidoo E., Juminaga D., Kuo D., Benke P. I., Dietrich J. A., Ma S. M., Arkin A. P., Petzold C. J., Adams P. D., Keasling J. D., Chhabra S. R. (2012). Manipulation of the carbon storage regulator system for metabolite remodeling and biofuel production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 11(79): 1-12
 58. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988). A simple salting out procedure of extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16(3): 1215
 59. Mukherjee A., Cui Y, Liu Y, Dumenyo C. K., Chatterjee A. K. (1996). Global regulation in *Erwinia* species by *Erwinia carotovora* *rsmA*, a homologue of *Escherichia coli* *csrA*: repression of secondary metabolites, pathogenicity and hypersensitive reaction. *Microbiol.* 142(1): 427-34
 60. Mukherjee S., Yakhnin H., Kysela D., Sokoloski J., Babitzke P., Kearns D. B. (2011). CsrA-FliW interaction governs flagellin homeostasis and a checkpoint on flagellar morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 82(2): 447-61
 61. Mukherjee S., Oshiro R. T., Yakhnin H., Babitzke P., Kearns D. B. (2016). FliW antagonizes CsrA RNA binding by a noncompetitive allosteric mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 113(35): 9870-5

62. Moll S., Schneider D. J., Stodghill P., Myers C. R., Cartinhour S.W., Filiatrault M. J. (2010). Construction of an *rsmX* co-variance model and identification of five *rsmX* non-coding RNAs in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *RNA Biol.* 7(5): 508-16.
63. Moolenaar G. F., van Sluis C. A., Backendorf C., van de Putte P. (1987). Regulation of the *Escherichia coli* excision repair gene *uvrC*. Overlap between the *uvrC* structural gene and the region coding for a 24 kD protein. *Nucleic Acids Res.* 15(10): 4273-89
64. Nagasawa S., & Tokishita S. (1994). A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J.* 13(21): 5195-202
65. Nelson D. L. & Cox M. M. Lehninger. (2008). Principles of Biochemistry. 5th edition. New York: W.H. Freeman and Company; 1158 p.
66. Pannuri A., Vakulskas C. A., Zere T., Mcgibbon L. C., Adrienne N., Georgellis D., Babitzke P., Romeo T. (2016). Circuitry linking the catabolite repression and Csr global regulatory systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 198(21): 3000-15
67. Pérez-Morales D., Banda M. M., Chau N. Y. E., Salgado H., Martínez-Flores I., Ibarra J. A., Ilyas B., Coombes B. K., Bustamante V. H. (2017). The transcriptional regulator SsrB is involved in a molecular switch controlling virulence lifestyles of *Salmonella*. *PLoS Pathog.* 13(7): e1006497
68. Pernestig A. K., Melefors Ö., Georgellis D. (2001). Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 276(1): 225-31
69. Prehna G., Zhang G., Gong X., Duszyk M., Okon M., McIntosh L. P., Weiner J. H., Strynadka N. C. J. (2012). A protein export pathway involving *Escherichia coli* porins. *Structure.* 20(7): 1154-66.
70. Price-Carter M., Tingey J., Bobik T. A., Roth J. R. (2001). The alternative electron acceptor tetrathionate supports B₁₂-dependent anaerobic growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol. *J Bacteriol.* 183(8): 2463-75
71. Que F., Wu S., Huang R. (2013). *Salmonella* Pathogenicity Island 1(SPI-1) at Work. *Curr Microbiol.* 66: 582-87
72. Reimann C., Valverde C., Kay E., Haas D. (2005). Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol.* 187 (1): 276-85
73. Rivera-Chávez F., Lopez C. A., Bäumlér A. J. (2017). Oxygen as a driver of gut dysbiosis. *Free Radic Biol Med.* 105: 93-101
74. Romeo T., Gong M. I. N., Liu M. U. Y. A. (1993). Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol.* 175(15): 4744-55

75. Romeo T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol.* 29(6): 1321-30
76. Rotger R., & Casadesús J. (1999). The virulence plasmids of *Salmonella*. *Internatl Microbiol.* 2(3): 177-84
77. Sabbagh S. C., Forest C. G., Lepage C., Leclerc J-M., Daigle F. (2010). So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett.* 305: 1-13
78. Sabnis N. A., Yang H., Romeo T. (1995). Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *J Biol Chem.* 270(49): 29096-104
79. Sahr T., Rusniok C., Impens F., Oliva G., Sismeiro O., Coppée J. Y., Buchrieser C. (2017). The *Legionella pneumophila* genome evolved to accommodate multiple regulatory mechanisms controlled by the CsrA-system. *PLoS Genet.* 13(2): e1006629
80. Seyll E. & Van Melderen L. (2013). The ribonucleoprotein Csr network. *Int J Mol Sci.* 14(11): 22117-31
81. Simons R. W., Houman F., Kleckner N. (1987). Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene.* 53(1): 85-96
82. Stecher B., Hapfelmeier S., Müller C., Kremer M., Stallmach T., Hardt W. D. (2004). Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun.* 72(7): 4138-50
83. Stecher B., Robbiani R., Walker A. W., Westendorf A. M., Barthel M., Kremer M., Chaffron S., Macpherson A. J., Buer J., Parkhill J., Dougan G., von Mering C., Hardt W.D. (2007). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 5(10): e244
84. Sterzenbach T., Nguyen K. T., Nuccio S. P., Winter M. G., Vakulskas C. A., Clegg S., Romeo T., Bäumler A. J. (2013). A novel CsrA titration mechanism regulates fimbrial gene expression in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.* 32(21): 2872-83
85. Sturm A., Heinemann M., Arnoldini M., Benecke A., Ackermann M., Benz M., Dormann J., Hardt W.D. (2011). The Cost of virulence: retarded growth of *Salmonella* Typhimurium cells expressing Type III secretion system 1. *PLoS Pathog.* 7(7): e1002143
86. Sowa S., Gelderman G., Leistra A. N., Buvanendiran A., Lipp S., Pitaktong A., Vakulskas C. A., Baldea M., Contreras L. M. (2017). Integrative FourD omics approach profiles the target network of the carbon storage regulatory system. *Nucleic Acids Res.* 45(4): 1673-86

87. Suzuki K., Wang X., Weilbacher T., Perstig A. K., Melefors Ö., Georgellis D., Babitzke P., Romeo T. (2002). Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 184(18): 5130-40
88. Suzuki K., Babitzke P., Kushner S. R., Romeo T. (2006). Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Gene Dev.* 20(18): 2605-17
89. Teplitski M., Goodier R. I., Ahmer B. M. M. (2006). Catabolite repression of the SirA regulatory cascade in *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol.* 296(2006): 449-66
90. Timmermans J., & Van Melder L. (2009). Conditional essentiality of the *csrA* gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 191(5): 1722-24
91. Timmermans J., & Van Melder L. (2010). Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell Mol Life Sci.* 67(17): 2897-908
92. Uzzau S., Figueroa-bossi N., Rubino S., Bossi L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(26): 15264-69
93. Vakulskas C. A., Pannuri A., Cortés-Selva D., Zere T. R., Ahmer B. M., Babitzke P., Romeo T. (2014). Global effects of the DEAD-box RNA helicase DeaD (CsdA) on gene expression over a broad range of temperatures. *Mol Microbiol.* 92(5): 945-58
94. Vakulskas C. A., Potts A. H., Babitzke P., Ahmer B. M. M., Romeo T. (2015). Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiol Mol Biol R.* 79(2): 193-224
95. Vakulskas C. A., Leng Y., Abe H., Amaki T., Okayama A., Babitzke P., Suzuki K., Romeo T. (2016). Antagonistic control of the turnover pathway for the global regulatory sRNA CsrB by the CsrA and CsrD proteins. *Nucleic Acids Res* 44(16): 1-15
96. Vidal S., Tremblay M. L., Govoni G., Gauthier S., Sebastiani G., Malo D., Skamene E., Olivier M., Jothy S., Gros P. (1995). The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J Exp Med.* 182: 655-66
97. Wang X., Dubey A. K., Suzuki K., Baker C. S., Babitzke P., Romeo T. (2005). CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 56(6): 1648-63
98. Wei B. L., Brun-Zinkernagel A. M., Simecka J. W., Prüß B. M., Babitzke P., Romeo T. (2001). Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 40(1): 245-56
99. Weilbacher T., Suzuki K., Dubey A. K., Wang X., Gudapaty S., Morozov I., Baker C. S., Georgellis D., Babitzke P., Romeo T. (2003). A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 48(3): 657-70

100. Winter S. E., Thiennimitr P., Winter M. G., Butler B. P., Huseby D. L., Crawford R. W., Russell J. M., Bevins C. L., Adams L. G., Tsois R. M., Roth J. R., Bäuml A. J. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*. 467: 426-29
101. Worley M.J., Ching K.H., Heffron F. (2000) *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Mol Microbiol*. 36(3): 749-61
102. Xie F., Liu T., Qian W. J., Petyuk V. A., Smith R. D. (2011). Liquid chromatography-mass spectrometry-based quantitative proteomics. *J Biol Chem*. 286(29): 25443-9
103. Yakhnin H., Yakhnin A. V, Baker C. S., Sineva E., Berezin I., Romeo, T., Babitzke P. (2011). Complex regulation of the global regulatory gene *csrA*: CsrA-mediated translational repression, transcription from five promoters by $E\sigma^{70}$ and $E\sigma^S$, and indirect transcriptional activation by CsrA. *Mol Microbiol*. 81(3): 689-704
104. Yoo W., Kim D., Yoon H., Ryu S. (2017). Enzyme IIA^{Ntr} regulates *Salmonella* invasion via 1,2-propanediol and propionate catabolism. *Nature Sci Rep*. 7: 44827
105. Zere T. R., Vakulskas C. A., Leng Y., Pannuri A., Potts A. H., Dias R., Tang D., Kolaczowski B., Georgelis D., Ahmer B. M. M., Romeo T. (2015). Genomic targets and features of BarA-UvrY (-SirA) signal transduction systems. *PLoS ONE*. 10(12): e0145035
106. Zhang G., Brox S., Weiner J. H. (2006). Extracellular accumulation of recombinant proteins fused to the carrier protein YebF in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*. 24(1): 100-4
107. Zhou W., Smith J. W., Huang C. M. (2010). Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics. *J Biomed Biotechnol*. 840518: 1-6