



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Regulación de la expresión y papel en virulencia de los genes *phoH* y *SL1896* de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

MARCOS ANTONIO VALDESPINO DÍAZ

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN

Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. DANIEL GENARO SEGURA GONZÁLEZ

Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra. ISABEL GÓMEZ GÓMEZ

Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad de México. Junio, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este proyecto 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:

Dr. Daniel Genaro Segura González

Dra. Isabel Gómez Gómez

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Presidente: Dr. Mario Soberón Chávez

Secretario: Dra. Katy Juárez López

Vocal: Dr. David Romero Camarena

Vocal: Dra. Cinthia Ernestina Núñez López

Vocal: Dr. Tomás Villaseñor Toledo

Durante el desarrollo de esta tesis recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 594831); así como apoyo de proyectos PAPIIT (IN203415 y IN202418) y de CONACYT C-B (254531) para la realización de mi trabajo de investigación.

Dedico esta tesis a quien considero la persona más importante de mi vida. A quien siempre me ha apoyado y comprendido. A quien no ha dejado de creer, incluso cuando me han faltado fuerzas...

*Para mi madre Julia Díaz,
con todo el amor, cariño y admiración del mundo*

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres, Julia y José por traerme al mundo y ayudarme a ser la persona que hoy soy. A mis hermanos Aristico y Ludmila que siempre han cuidado de mí y me han brindado su cariño. Siempre me sentiré afortunado de haber crecido al lado de ustedes. ¡Gracias por tanto cariño!

A mi tutor, el Dr. Víctor Bustamante, que me acogió en su grupo y del cual he aprendido y espero continuar aprendiendo muchas cosas. Ha sido un privilegio contar con su asesoría.

A la Dr. Isabel Gómez y el Dr. Daniel Segura por aceptar ser parte de mi comité tutorial y brindarme siempre sus consejos oportunos.

A los miembros del jurado de mi examen de maestría por revisar la tesis y darle un mejor acabado con sus conocimientos. Todas sus valoraciones fueron muy consideradas.

A todos los sideróforos/salmonellos, con los que tantos buenos momentos he pasado y espero falten muchos más. A todos muchas gracias por ayudarme en todo lo que han podido. Especialmente quiero agradecerle a Doña Rebe y a Mario, ya que con su trabajo han sido fundamentales para el desarrollo de este proyecto.

A todos los amigos que han hecho muy divertida mi estancia en México y de los que también aprendo cada día. Gracias a todos ustedes por abrirme un pedacito de sus corazones, de sus hogares, de sus vidas. En especial, le escribo unas palabras con mucho cariño a Arline, cuya amistad ha sido una hermosa sorpresa y a quien espero poder retribuirle todo el cariño y la invaluable compañía.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo para la asistencia al V Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias.

A todos, mi agradecimiento infinito

LISTA DE ABREVIATURAS:

ATP	Adenosín trifosfato
°C	Grados centígrados
C	Citocina
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EMSA	Ensayo de retardo en gel
g	Gramo
G	Guanina
IL	Interleucina
kV	kilovolt
LB	Lysogenic Broth
MM-N	Medio Mínimo N
M	Molar
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mL	Mililitro
ms	Milisegundo
nm	nanómetro
nM	Nanomolar
NTS	<i>Salmonella</i> No Tifoidea
OMS	Organización Mundial de la Salud

PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PBS-T	Amortiguador salino de fosfatos con Tween
Pi	Fósforo inorgánico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
rpm	Revoluciones por minuto
RNA _m	RNA mensajero
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
s	Segundo
SST3	Sistema de secreción tipo tres
SCV	Vacuolas contenedoras de <i>Salmonella</i>
TNF- α	Factor de necrosis Tumoral alfa
UV	Ultravioleta
V	Voltios
WT	Cepa silvestre

ÍNDICE GENERAL:

RESUMEN.....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. El género <i>Salmonella</i> y su importancia.....	13
1.2. Patogénesis.....	15
1.3. Factores de virulencia de <i>Salmonella</i>	17
1.3.1. Islas de patogenicidad de <i>Salmonella enterica</i>	18
1.3.1.1. SPI-1.....	19
1.3.1.2. Regulación de SPI-1.....	22
1.4. Regulador HilD.....	26
II. ANTECEDENTES.....	29
III. HIPÓTESIS.....	31
IV. OBJETIVOS.....	31
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
5.1. Purificación de plásmidos por Miniprep.....	36
5.2. Preparación de células electrocompetentes.....	37
5.3. Electroporación.....	37
5.4. Construcción de cepas mutantes $\Delta phoH::km$, $\Delta SL1896::km$ y $\Delta phoB::km$	38
5.5. Construcción de cepas $phoH_{STM-3XFLAG-km}$ y $phoH_{Ec-3XFLAG-km}$	40
5.6. Ensayo de invasión a células epiteliales y macrófagos RAW264.7.....	41
5.7. Ensayo de sobrevivencia y replicación en células epiteliales y macrófagos RAW264.7.....	42

5.8.	Ensayo de movilidad en agar.....	43
5.9.	Construcción de las fusiones transcripcionales.....	43
5.10.	Cultivos bacterianos para la cuantificación de la expresión de genes.....	44
5.11.	Cuantificación de la actividad enzimática específica de CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa).....	46
5.12.	Inmunodetección de proteínas mediante “Western blot”	47
5.13.	Análisis Estadístico.....	48
VI.	RESULTADOS.....	49
6.1.	Construcción de las mutantes de <i>S. Typhimurium</i> $\Delta phoH::km$ y $\Delta SL1896::km$	49
6.2.	Los genes <i>phoH</i> y <i>SL1896</i> no están implicados en la invasión de <i>S. Typhimurium</i> a células HeLa o macrófagos.....	51
6.3.	El gen <i>SL1896</i> , pero no <i>phoH</i> , parece estar implicado en la replicación y sobrevivencia de <i>S. Typhimurium</i> dentro de macrófagos.....	53
6.4.	El gen <i>phoH</i> se requiere para la movilidad de <i>S. Typhimurium</i>	54
6.5.	La secuencia de la región intergénica corriente arriba de <i>phoH</i> es diferente en <i>S. Typhimurium</i> SL1344 y <i>E. coli</i> K-12.....	56
6.6.	La expresión del gen <i>phoH</i> de <i>S. Typhimurium</i> , pero no del gen <i>phoH</i> de <i>E. coli</i> K-12, se induce en LB por HiID.....	58
6.6.1.	La expresión del gen <i>phoH</i> de <i>S. Typhimurium</i> responde a niveles de Pi de manera independiente de PhoB.....	62

	6.6.2. PhoP y SsrB no están involucrados en la expresión de <i>phoH</i> de <i>S. Typhimurium</i>	64
VII.	DISCUSIÓN.....	66
VIII.	CONCLUSIONES.....	72
IX.	PERSPECTIVAS.....	73
X.	APÉNDICE.....	74
	10.1. Medios de cultivo empleados.....	74
	10.2. Reactivos empleados para los ensayos de invasión y replicación/sobrevivencia en células HeLa y macrófagos RAW 264.7.....	76
	10.3. Reactivos empleados para “Western blot”.....	77
XI.	CITAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Progreso de la infección causada por <i>Salmonella</i>	18
Figura 2. Representación esquemática de los genes codificados en la isla de patogenicidad 1 de <i>Salmonella</i> (SPI-1).....	20
Figura 3. Modelo de activación de SPI-1.....	23
Figura 4. Representación esquemática del regulón de HiiD.....	28
Figura 5. El gen <i>SL1896</i> se encuentra en una región donde predominan genes flagelares.....	30
Figura 6. Creación de cepas mutantes $\Delta phoH::km$ y $\Delta SL1896::km$ por el método de mutagénesis sitio dirigida usando productos de PCR.....	50
Figura 7. Caracterización por PCR de las cepas mutantes <i>S. Typhimurium</i> $\Delta phoH::km$ y $\Delta SL1896::km$	51
Figura 8. <i>phoH</i> y <i>SL1896</i> no se requieren para la invasión de <i>S. Typhimurium</i> a células HeLa y macrófagos.....	52
Figura 9. <i>SL1896</i> parece tener un papel en la replicación y sobrevivencia de <i>S. Typhimurium</i> dentro de macrófagos.....	54
Figura 10. <i>phoH</i> , pero no <i>SL1896</i> , se requiere para la movilidad de <i>S. Typhimurium</i>	55
Figura 11. Las secuencias intergénicas corriente arriba de <i>phoH</i> en <i>S. Typhimurium</i> SL1344 y <i>E. coli</i> K-12 son diferentes.....	57
Figura 12. Los genes ancestrales <i>hfq</i> y <i>ompR</i> están conservados en <i>S. Typhimurium</i> SL1344 y <i>E. coli</i> K-12.....	58

Figura 13. La expresión de <i>phoH</i> de <i>S. Typhimurium</i> SL1344, pero no de <i>phoH</i> de <i>E. coli</i> K-12, se induce en LB.....	61
Figura 14. El gen <i>pstS</i> está conservado en <i>S. Typhimurium</i> SL1344 y <i>E. coli</i> K-12.....	62
Figura 15. <i>phoH</i> responde a niveles de Pi en <i>S. Typhimurium</i> de manera independiente de PhoB.....	64
Figura 16. PhoP y SsrB no regulan la expresión de <i>phoH</i> de <i>S. Typhimurium</i> en medio mínimo.....	65
Figura 17. Modelo ilustrativo de la regulación de la expresión de <i>phoH</i> en <i>S. Typhimurium</i> y <i>E. coli</i> K-12.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.....	32
Tabla 2. Plásmidos empleados en este trabajo.....	33
Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.....	34
Tabla 4. Antibióticos empleados en este estudio.....	36

RESUMEN

La mayoría de los genes necesarios para la invasión de *Salmonella* Typhimurium a células del epitelio intestinal se encuentran en la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) del cromosoma bacteriano; cuyo principal regulador positivo es la proteína HilD, codificada en SPI-1. En estudios recientes se determinó que HilD regula la expresión de los genes *phoH* y *SL1896*, cuando se crece a *S. Typhimurium* en el medio rico en nutrientes LB. *phoH* es un gen conservado en un gran número de bacterias; en *E. coli* K-12 su expresión se induce por el sistema de dos componentes PhoR/PhoB, en respuesta a limitaciones de fosforo inorgánico (Pi). La proteína PhoH tiene capacidad de unión a ATP, pero su función celular permanece desconocida. El gen *SL1896* codifica para una proteína hipotética, de la cual solo se han encontrado ortólogos dentro del género *Salmonella*; su bajo contenido de G+C (40.8%) indica que fue adquirido por transferencia horizontal. Con el estudio del regulón de HilD se han identificado nuevos genes involucrados en la virulencia de *S. Typhimurium*; por tal motivo, en este trabajo se evaluó si *phoH* y *SL1896* se requieren para la invasión de *S. Typhimurium* a células hospederas y para la movilidad. Asimismo, se analizó si la regulación de *phoH* por HilD representa una nueva conexión reguladora que se adaptó durante la evolución de la patogenicidad de *S. Typhimurium*. Nuestros resultados sugieren que el gen *SL1896* tiene un papel en la replicación intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos y que el gen *phoH* está involucrado en la movilidad de *S. Typhimurium*. Por otra parte, nuestros resultados muestran que en *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12 la expresión de *phoH* se induce en Medio Mínimo N (MM-N) con bajo Pi, pero en *S. Typhimurium* esto ocurre de manera independiente al regulador PhoB. Interesantemente, en este estudio encontramos que el gen *phoH* de *S. Typhimurium*, pero no el de *E. coli* K-12, se expresa creciendo a las bacterias en LB, por su regulación positiva por HilD y probablemente otro regulador adicional. El gen *phoH* de *E. coli* K-12 no se expresó en LB, aun cuando su expresión se analizó en *S. Typhimurium*, sugiriendo que HilD reconoce la secuencia de *phoH* de *S. Typhimurium*, pero no la de *phoH* de *E. coli* K-12. Consistente con lo anterior, la secuencia de la región reguladora de *phoH* es poco conservada entre *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12, mientras que la secuencia del gen estructural muestra una identidad de 82% entre estas dos bacterias. Así, estos resultados muestran que durante la divergencia de *S. Typhimurium* de *E. coli* se generaron cambios en la secuencia de la región reguladora de *phoH*, lo cual estableció la regulación de *phoH* de *S. Typhimurium* por HilD, permitiendo la expresión de este gen en condiciones que favorecen la expresión de genes de virulencia de *Salmonella*. Asimismo, los cambios en la secuencia de la región reguladora también generaron que en *S. Typhimurium* la expresión de *phoH* se induzca en respuesta a bajo Pi por un regulador diferente a PhoB.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. El género *Salmonella* y su importancia

La familia *Enterobacteriaceae* comprende bacterias Gram-negativas, entre las que destacan géneros de importancia médica como *Salmonella*, que agrupa a bacterias patógenas tanto de humanos como de animales. Las bacterias pertenecientes a este género tienen forma de bacilo, son anaerobias facultativas, no forman esporas y presentan motilidad peritrica. Según el esquema Kauffmann-White, *Salmonella* se divide en dos especies: *S. bongori*, la cual infecta mayormente vertebrados de sangre fría, y *S. enterica*, que se divide en seis subespecies (*enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV), e *indica* (VI)). Sin embargo, casi la totalidad de las bacterias de este género que causan enfermedades en humanos y animales domésticos pertenecen a la subespecie *enterica*. Dentro de *S. enterica* subsp. *enterica* se pueden identificar más de 2,500 serovariantes, atendiendo a la especificidad antigénica del lipopolisacárido (antígeno O) y de la estructura de la flagelina (antígeno H) (Brenner et al., 2000; Fàbrega and Vila, 2013; Gourse et al., 2006; Grimont and Weill, 2008; Lan et al., 2009)

Los principales síntomas causados por la infección con *Salmonella* en humanos son la fiebre tifoidea o entérica y la gastroenteritis que conduce a diarrea. La fiebre tifoidea es una enfermedad sistémica invasiva causada por *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) y *S. Paratyphi*, que son patógenos exclusivos de humanos. Esta afección puede causar daño respiratorio, hepático, del bazo y/o neurológico, que pueden llegar a ser letales (Ohl and Miller, 2001; Parry et al., 2002; Raffatellu et al., 2006). La letalidad de esta infección se encuentra entre el

10 y 20%, cuando no es tratada con antibióticos, disminuyendo a menos del 1% con el tratamiento adecuado. Según las últimas estimaciones publicadas por la OMS en 2014, en el mundo se presentan aproximadamente 21 millones de casos y 222,000 muertes por fiebre tifoidea cada año (Bhan et al., 2005; Fàbrega and Vila, 2013; Mayer and Neilson, 2010)

Por otra parte, la gastroenteritis o salmonelosis, es producida por muchas serovariantes de *Salmonella* no tifoideas (NTS del inglés nontyphoidal *Salmonella*), siendo las más comunes *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*. Estas serovariantes tienen un amplio rango de hospedero y en humanos son la principal causa de diarrea bacteriana en países en desarrollo. La OMS estima alrededor de 93.8 millones de casos cada año, de los cuales aproximadamente 155,000 conllevan a la muerte (Callaway et al., 2008; Fàbrega and Vila, 2013; Majowicz et al., 2010). Esta infección generalmente permanece localizada en el intestino y nodos linfáticos mesentéricos. Los síntomas más comunes son dolor abdominal, calambres, diarrea asociada a inflamación del intestino grueso, náuseas y vómitos. El período de incubación es de 6 a 72 horas y si es eficientemente combatida por el sistema inmune del hospedero, la enfermedad generalmente no dura más de 10 días (Coburn et al., 2007; Fàbrega and Vila, 2013).

S. Typhimurium tiene la capacidad de afectar tanto a humanos como a diversos animales y dependiendo del hospedero puede ocasionar los dos tipos de infección. Debido a esto, se ha empleado como modelo para el estudio de los mecanismos moleculares por medio de los cuales *Salmonella* interactúa con las células del organismo huésped (Callaway et al., 2008; Fàbrega and Vila, 2013; Haraga et al., 2008).

1.2. Patogénesis

La infección por *Salmonella* se produce principalmente por el consumo de alimentos y agua contaminados, aunque el contacto con animales domésticos y silvestres como aves de corral, ganado, reptiles y anfibios que pueden ser portadores de la bacteria, también constituye un riesgo de infección en humanos (Anjum et al., 2005; Foley et al., 2008; Horton et al., 2013; Wray and Wray, 2000).

La primera barrera que debe vencer *Salmonella* dentro del hospedero es el pH ácido del estómago. Para contrarrestar el estrés ácido la bacteria activa una respuesta de tolerancia ácida que le permite mantener un pH intracelular mayor al del medio extracelular (Foster, 1995; Foster and Hall, 1991; Tiwari et al., 2004).

Después de llegar al intestino delgado *Salmonella* atraviesa la mucosa intestinal, sobreviviendo al ataque del sistema inmune innato, logrando alcanzar el epitelio subyacente. En ratones, *Salmonella* preferentemente se adhiere y es internalizada por las células M de las placas de Peyer por endocitosis (Bäumler et al., 1996; Clark et al., 1994). Sin embargo, las bacterias también son capaces de invadir los enterocitos no fagocíticos mediante un mecanismo que involucra un sistema de secreción tipo 3 codificado en la llamada isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1). Este mecanismo desarrollado por *Salmonella* induce un rearrreglo del citoesqueleto en los enterocitos, que provoca que las bacterias sean endocitadas y se formen dentro de las células huésped las llamadas vacuolas contenedoras de *Salmonella* (SCV del inglés *Salmonella*-containing vacuoles), nicho necesario para la sobrevivencia y replicación intracelular de las bacterias (Figura 1) (Fàbrega and Vila, 2013; Finlay et al., 1991; Haraga et al., 2008). Simultáneamente, en el epitelio intestinal se activa una respuesta secretora, que recluta fagocitos de la submucosa al lumen intestinal, lo cual está

asociado a la producción de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las interleucinas 8 (IL-8), IL-23 e IL-1 β (Santos et al., 2009). Este proceso inflamatorio provoca la acumulación de fluidos, desencadenando la diarrea, y también se remueve gran parte de la microbiota intestinal. Además, *Salmonella* es capaz de utilizar aceptores de electrones alternativos como el tetrionato y el nitrato que se producen en el intestino inflamado, lo que le confiere una ventaja para lograr la colonización del intestino delgado (Ahmer and Gunn, 2011; Lopez et al., 2012; Sana et al., 2016; Santos et al., 2009; Winter et al., 2010).

Una fracción de las SCV que se encuentran dentro de las células del epitelio, se translocan hacia la membrana basolateral y las bacterias pueden salir del epitelio. En esta zona existen fagocitos como los macrófagos y células dendríticas que internalizan a las bacterias; e incluso éstas últimas son capaces de extender sus proyecciones a través de las uniones estrechas del epitelio y fagocitar bacterias directamente desde el lumen intestinal (Johansson et al., 2006; Rescigno et al., 2001). Sin embargo, *Salmonella* es capaz de formar nuevamente las SCV y sobrevivir dentro de estas células, con lo cual se puede diseminar a otros órganos, como el hígado y bazo, donde preferentemente se replica, causando una infección sistémica (Fàbrega and Vila, 2013; Haraga et al., 2008; Ilyas et al., 2017; Pérez-Morales et al., 2017).

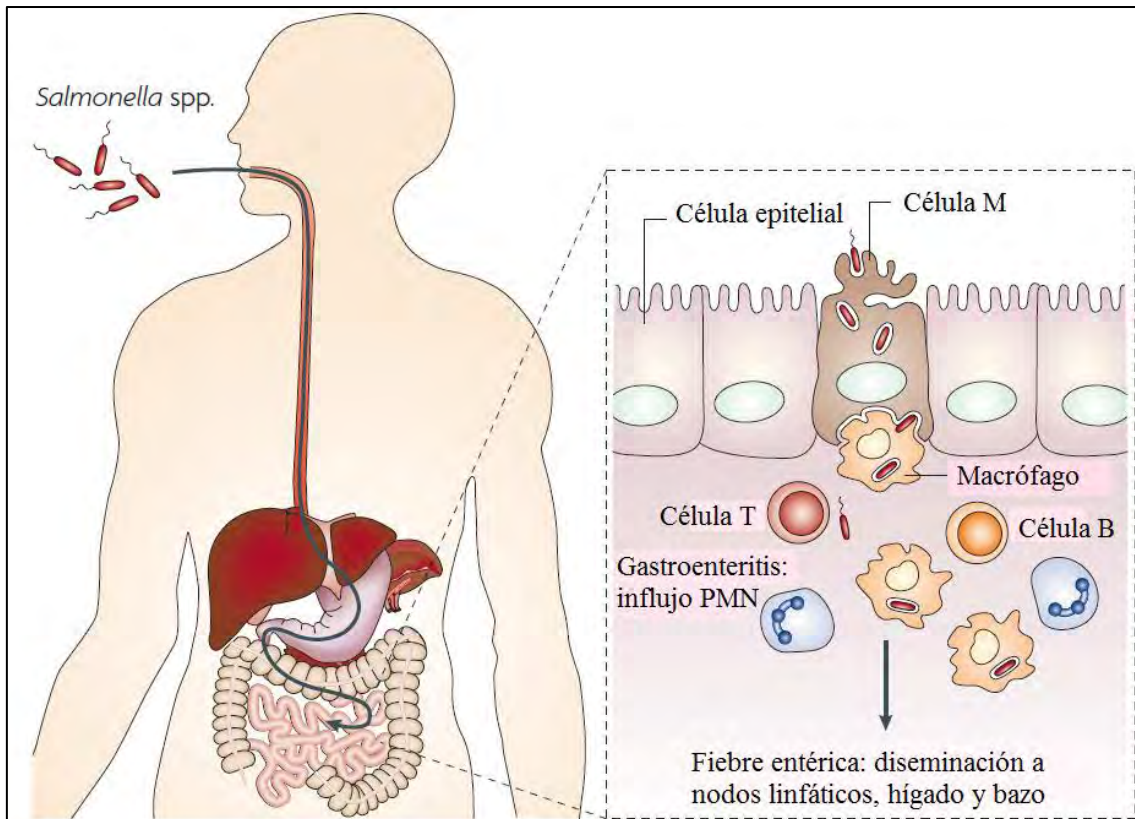


Fig. 1. Progreso de la infección causada por *Salmonella*. Al ser ingerida oralmente, *Salmonella* resiste el pH ácido del estómago y alcanza el lumen intestinal. Las bacterias invaden las células epiteliales, provocando la infección intestinal. Simultáneamente se induce una respuesta inflamatoria intestinal.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

1.3. Factores de virulencia de *Salmonella*

El impacto de la salmonelosis está determinado por las variadas estrategias que tiene la bacteria para evadir los mecanismos de defensas del hospedero; y además por el estado de salud del propio hospedero. La mayoría de los genes que codifican para los factores de virulencia más importante se encuentran en zonas del genoma denominadas islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs, del inglés *Salmonella* pathogenicity islands). Otros se encuentran en un plásmido de virulencia (pSLT) y en otras partes del cromosoma bacteriano. Entre los factores de virulencia de *Salmonella* podemos encontrar adhesinas, flagelo,

componentes esenciales para la formación del biofilm y proteínas que conforman distintos sistemas de secreción, así como las efectoras que son secretadas a través de éstos (Coburn et al., 2007; Fàbrega and Vila, 2013; Ilyas et al., 2017; Jones et al., 1982).

1.3.1. Islas de patogenicidad de *Salmonella enterica*

La mayoría de los genes de virulencia de *Salmonella* han sido adquiridos por transferencia horizontal y se encuentran agrupados en las SPIs (Fàbrega and Vila, 2013). Los genes de virulencia localizados en estas islas desempeñan un papel crucial en la patogénesis de *Salmonella*, específicamente en la colonización intestinal, invasión, replicación y sobrevivencia intracelular (Hensel, 2004; Sana et al., 2016).

Las islas de patogenicidad son diversas en cuanto a estructura y función y se conocen alrededor de 12 dentro de la especie *S. enterica*. Sin embargo, todas comparten determinadas características: (i) contienen uno o más genes de virulencia, (ii) están presentes en cepas patógenas y ausentes en aquellas no patógenas, (iii) han sido adquiridas por eventos de transferencia horizontal, lo que se evidencia por las diferencias en el contenido de G+C, en comparación al resto del genoma bacteriano, (iv) abarcan grandes extensiones del genoma, que normalmente van desde 10kb hasta más de 100kb; aunque algunas cepas tienen pequeñas regiones de DNA (1-10kb) llamadas islotes de patogenicidad, (v) generalmente están flanqueadas por un gen de tRNA y secuencias repetidas directas, (vi) algunas son genéticamente inestables y en estos casos codifican algún elemento de movilidad del DNA (integrasas, transposasas, secuencias repetidas directas, genes de bacteriófagos, orígenes de replicación de

plásmidos, entre otros) (Gal-Mor and Finlay, 2006; Hacker et al., 1997; Hensel, 2004).

1.3.1.1 SPI-1

La isla de patogenicidad 1 (SPI-1) se encuentra en todos los miembros del género *Salmonella* y está insertada entre los genes *ygbA* y *mutS*, que en *E. coli* K-12 se encuentran consecutivos. Es una de las islas mejor caracterizadas, se ubica en el centisoma 63 del cromosoma, consta de 39 genes y tiene un tamaño de 40 kb (Figura 2). Presenta un contenido de G+C significativamente menor (42%) al resto del genoma de *Salmonella* (52%), pero no está asociado con genes de tRNA o de movilidad del DNA (Hensel, 2004; Mills et al., 1995; Que et al., 2013).

SPI-1 codifica varias proteínas efectoras que se encuentran codificadas en los operones *sic/sip* y el gen *avrA*. Las proteínas efectoras son translocadas a las células huésped a través de un sistema de secreción tipo 3 (SST3-1) también codificado en SPI-1 (operones *prg/org* e *inv/spa*), el cual funciona como una jeringa molecular y es indispensable en la invasión dependiente de SPI-1. Además, existen otras proteínas efectoras codificadas en otras zonas del genoma, que también son inyectadas a través de este sistema de secreción (Fàbrega and Vila, 2013; Lostroh and Lee, 2001; Que et al., 2013). Dentro de SPI-1 también se encuentran codificados reguladores transcripcionales (HilD, HilC, HilA, SprB e InvF) que inducen la expresión de los genes de esta isla, y chaperonas (codificadas por los operones *sic* e *inv*). Estas chaperonas protegen a las proteínas relacionadas con SPI-1 de la degradación, de interacciones prematuras y median su reconocimiento por el SST3-1 (Fàbrega and Vila, 2013; Hensel, 2004).

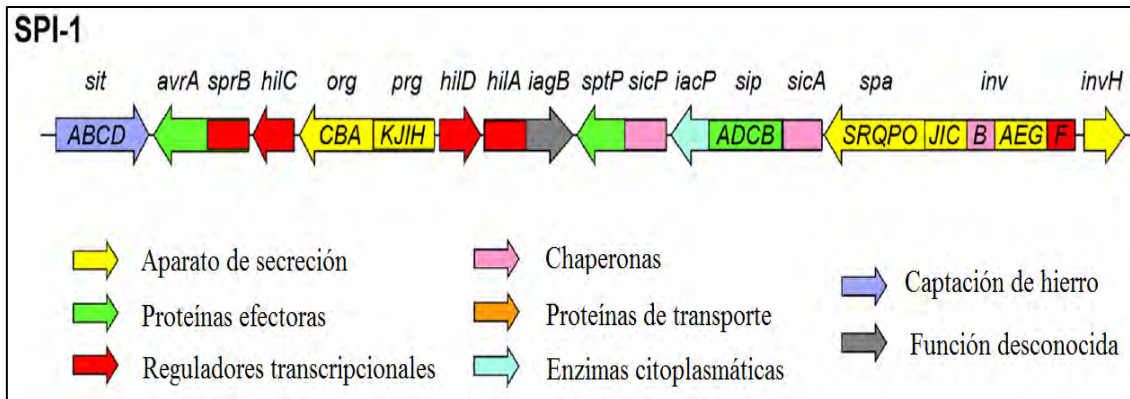


Fig. 2. Representación esquemática de los genes codificados en la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1) (Adaptado de Fàbrega and Vila, 2013).

SPI-1 juega un papel fundamental en la interacción de *Salmonella* con sus células hospederas, participando en el proceso de invasión, su función más estudiada. Sin embargo, también se ha evidenciado la actividad de SPI-1 en la replicación intracelular y la modulación de la respuesta del hospedero (Que et al., 2013).

El proceso de adhesión de *Salmonella* a las células hospederas comienza antes de la inducción de la expresión de SPI-1. Sin embargo, algunas proteínas efectoras de esta isla aparecen antes que se produzca el contacto bacteria-hospedero y son importantes en esta etapa (Desin et al., 2010; Lara-Tejero and Galán, 2009). Por otra parte, el sistema de secreción tipo 3 de SPI-1 media la adhesión a células no fagocíticas, como las células HeLa. Esto ocurre gracias a la translocación concertada de proteínas efectoras, que provocan el rearrreglo del citoesqueleto de las células hospederas e invaginaciones de la membrana llamadas “membrane ruffles” que permiten la internalización de *Salmonella* (Clark et al., 2011; Lu et al., 2010; Misselwitz et al., 2011). Además, existen evidencias de que SPI-1 también es capaz de modular la invasión de células

fagocíticas como las células dendríticas y linfocitos B (Bueno et al., 2010; Que et al., 2013; Rosales-Reyes et al., 2012).

Como había sido mencionado anteriormente, una vez que *Salmonella* se internaliza en las células hospederas, forma las llamadas vacuolas contenedoras de *Salmonella* (SCV) que son el nicho idóneo para la replicación y sobrevivencia de las bacterias (Fàbrega and Vila, 2013; Haraga et al., 2008; Ilyas et al., 2017). Se conoce que los genes de la isla de patogenicidad 2 (SPI-2) son muy importantes en esta etapa intracelular. Sin embargo, algunas proteínas efectoras de SPI-1 como SopB y SipA, intervienen en el tráfico de las SCV e impiden la unión de éstas a los lisosomas; mientras que SptP recluta otras proteínas que promueven la replicación de *Salmonella*. De manera que, tanto el SST3-2 como el SST3-1 son necesarios para la replicación en células fagocíticas y no fagocíticas (Bakowski et al., 2010; Humphreys et al., 2009; Mallo et al., 2008; Radtke et al., 2010).

Una de las estrategias que utiliza *Salmonella* para establecer la infección es modular la respuesta de las células hospederas. De hecho, se ha podido determinar que algunas toxinas de SPI-1 son capaces de inducir o reprimir la muerte celular en distintos momentos de la infección (Que et al., 2013). Un aspecto importante durante la patogénesis de *Salmonella* es la inducción de inflamación en el epitelio intestinal. Por ejemplo, la proteína SopE se secreta a través del SST3-1, y es capaz de inducir muerte celular vía caspasa-1 en los enterocitos. Por su parte, se ha descrito que la proteína efectora SipB induce la muerte de macrófagos de maneras tanto dependiente como independiente de caspasa 1. (Fink and Cookson, 2007; Müller et al., 2009; Takaya et al., 2005).

Sin embargo, una acelerada muerte celular puede ser perjudicial para la propia sobrevivencia de *Salmonella*. Por tal motivo, otras proteínas de SPI-1 tienen un efecto contrario, o sea, reprimir la inducción de muerte celular; sobre todo en etapas donde es necesario adaptarse al ambiente celular hospedero. Tanto en modelos celulares como en animales de laboratorio, se ha demostrado que algunas toxinas de SPI-1, como AvrA y SopB, previenen la liberación de citoquinas proinflamatorias y protegen a las células epiteliales de la muerte celular. Además, otros estudios han demostrado que SPI-1 también puede evitar la expresión de citoquinas proinflamatorias en macrófagos, lo que le permite a las bacterias permanecer en el interior celular y diseminarse, provocando infección sistémica (Knodler et al., 2005; Pavlova et al., 2011; Que et al., 2013).

1.3.1.2. Regulación de SPI-1

Salmonella ha adaptado mecanismos complejos que controlan la expresión de sus genes de virulencia en el tiempo y nicho apropiado. *In vivo*, los genes de SPI-1 se expresan cuando las bacterias se encuentran en el lumen intestinal o asociadas al epitelio o a enterocitos en proceso de extrusión, así como en subpoblaciones de bacterias hiperreplicativas en el citosol de células epiteliales. *In vitro*, los genes de SPI-1 se expresan durante el crecimiento en la fase estacionaria temprana en medios de cultivo ricos en nutrientes como el medio LB, baja concentración de oxígeno, alta osmolaridad y pH ligeramente alcalino; condiciones que asemejan al ambiente intestinal (Altier, 2005; Lundberg et al., 1999; Martínez et al., 2014).

La expresión de los genes de SPI-1 está controlada por múltiples reguladores codificados dentro y fuera de esta isla (Fàbrega and Vila, 2013). SPI-1 codifica para HilD, HilC e InvF, los cuales pertenecen a la familia de reguladores

transcripcionales AraC/XylS, así como para HilA que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales OmpR/ToxR. HilD forma un circuito de retroalimentación positiva con HilC y RtsA (codificado en otra región del cromosoma y también perteneciente a la familia AraC/XylS), el cual activa en cascada la expresión de los genes de SPI-1 mediante la inducción de la expresión de HilA (Ellermeier et al., 2005; Saini et al., 2010). HilA entonces activa directamente la expresión de algunos genes de SPI-1, como los operones que codifican para los componentes del T3SS-1, y el que codifica para InvF, regulador que a su vez activa la expresión del resto de genes de SPI-1, como son los operones que codifican las proteínas efectoras y el operón *sipBCD* (Figura 3). Además, el circuito formado por HilD, HilC y RtsA también puede activar la expresión de *invF* y algunas proteínas efectoras de manera independiente a HilA; lo que posibilita la expresión de SPI-1 mediante diferentes rutas (Colgan et al., 2016; Fàbrega and Vila, 2013; Thijs et al., 2007).

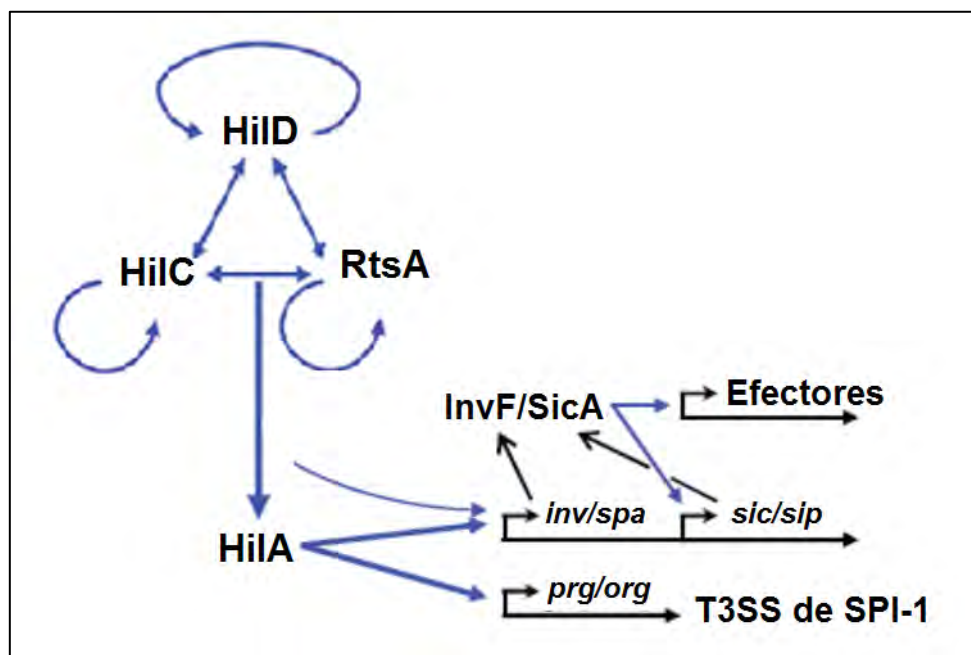


Fig. 3. Modelo de activación de SPI-1. Las flechas azules indican activación transcripcional de los genes. Las flechas negras indican algunos productos génicos codificados en operones de SPI-1 (Adaptado de Ellermeier et al., 2005).

Además de la regulación intrínseca de SPI-1, existen otros reguladores fuera de la isla que modulan su expresión. Un ejemplo de ello, son las proteínas asociadas a nucleoide, las cuales tienen la capacidad de unirse al DNA y modificar su topología, lo cual puede inducir o reprimir la expresión de genes (Dillon and Dorman, 2010). La proteína H-NS juega un papel muy importante en la represión transcripcional de genes bacterianos, sobre todo aquellos que han sido adquiridos por transferencia horizontal, como los de SPI-1. Algunos estudios han demostrado la represión que ejerce H-NS sobre *hilA*, *hilD*, *hilC* y *rtsA* en condiciones no inductoras de SPI-1 (Hinton et al., 1992; Olekhovich and Kadner, 2007). Hha es otra proteína asociada a nucleoide que también contribuye a la represión de SPI-1, aunque con un impacto menor que H-NS. Se ha demostrado que Hha es capaz de unirse a los promotores de *hilA* y *rtsA*, aunque también reprime a *hilC*. Se plantea que la función de HilD, HilC y RtsA es contrarrestar la represión que ejercen H-NS y Hha sobre sus genes blanco (Fahlen et al., 2001; Olekhovich and Kadner, 2007, 2006; Schechter and Lee, 2001).

Unos de los reguladores negativos más importantes de SPI-1 es la proteína HilE, cuyo gen se encuentra en otra zona del genoma con características similares a las de una isla de patogenicidad. La sobreproducción de HilE provoca una drástica disminución en la expresión de *hilA*, debido a que esta proteína inactiva a HilD mediante una interacción proteína-proteína, la cual interfiere la

dimerización de HilD e impide su interacción con el DNA (Baxter et al., 2003; Grenz et al., 2018; Paredes-Amaya et al., 2018).

Los sistemas de dos componentes son ampliamente utilizados por los microorganismos para detectar y responder a cambios en el ambiente (Gao and Stock, 2009). Debido a la importancia que tienen los genes de SPI-1 éstos deben expresarse o reprimirse solo en los momentos precisos; y es entonces donde los sistemas de dos componentes juegan un papel fundamental. Un ejemplo son los sistemas BarA-SirA y EnvZ-OmpR, los cuales inducen la expresión de SPI-1. El par BarA-SirA participa en diversos procesos como el metabolismo del carbono, la motilidad, formación de biofilm y la virulencia (Romeo et al., 1993; Teplitski et al., 2006, 2003). SirA activa la expresión de CsrB y CsrC, dos RNA pequeños que inhiben la producción de CsrA, una proteína que se une a RNA mensajeros y altera su estabilidad. Uno de los RNA blanco de CsrA es el de *hilD*, impidiendo su traducción. De forma que, la activación de BarA-SirA impide la represión que ejerce CsrA sobre *hilD*, lo que permite la activación de SPI-1 (Altier et al., 2000; Fortune et al., 2006). El sistema EnvZ-OmpR responde a cambios de osmolaridad y se plantea que el regulador de respuesta OmpR activa postranscripcionalmente a HilD, aunque este mecanismo está menos esclarecido (Ellermeier et al., 2005; Igo et al., 1989).

Por otra parte, el sistema PhoQ-PhoP se activa a bajas concentraciones de cationes y bajo pH, condiciones semejantes a las de las SCV dentro de macrófagos, las cuales no son condiciones inductoras de SPI-1 (García Véscovi et al., 1996). De hecho, se ha reportado que el regulador PhoP reprime los genes *prg* (PhoP-repressed genes) de SPI-1 y se plantea que este efecto es a través de la regulación postranscripcional que ejerce sobre HilD (Behlau and Miller,

1993; Pegues et al., 1995). Otros sistemas que reprimen la expresión de SPI-1 son PhoR-PhoB y RcsC-RcsD-RcsB (Fàbrega and Vila, 2013). El sistema PhoR-PhoB se activa en condiciones de bajo fósforo inorgánico extracelular e induce la expresión de los genes *fimYZ*, que a su vez activan la expresión de HilE y por tanto se inactiva a HilD (Jones, 2005; Lucas et al., 2000). Por su parte, el sistema Rcs se activa ante un shock osmótico, en crecimiento sobre superficies sólidas, desecación o a bajas temperaturas (20 °C) (Huang et al., 2006). Varios son los genes de SPI-1 que se reprimen por este sistema (*hilA*, *hilC*, *hilD*, *invF*, etc); posiblemente su efecto sea mediante una regulación postranscripcional sobre HilD (Fàbrega and Vila, 2013). Cuando *Salmonella* se encuentra dentro de las células hospederas los genes de SPI-1 se reprimen y se activan aquéllos genes necesarios para la replicación y sobrevivencia intracelular, principalmente los de SPI-2 (Bustamante et al., 2008; Martínez et al., 2014). Recientemente se ha demostrado que el sistema de dos componentes SsrA-SsrB, principal activador de SPI-2, reprime la expresión de *hilD* e *hilA* por unión directa de SsrB al promotor de ambos genes. Lo anterior es una evidencia de cómo va ocurriendo la transición de *Salmonella* de una fase extracelular a una intracelular (Pérez-Morales et al., 2017).

1.4. Regulador HilD

HilD pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS y está codificado en SPI-1. Consta de 309 aminoácidos, su tamaño es de 34.3 kDa y tiene dos dominios HTH de unión a DNA en su extremo C-terminal (Schechter and Lee, 2001).

HilD regula positivamente la expresión de varios genes, dentro y fuera de SPI-1. Sobre algunos de éstos actúa directamente, contrarrestando la represión que

ejerce la proteína HN-S sobre los promotores de dichos genes; y sobre otros actúa de forma indirecta a través de otros reguladores (Figura 4) (Colgan et al., 2016; Fàbrega and Vila, 2013; Martínez-Flores et al., 2016; Petrone et al., 2014; Saini and Rao, 2010). Como se explicó anteriormente, HilD tiene un papel predominante sobre la activación de SPI-1; sin embargo, de manera interesante, se ha comprobado que también activa la expresión del sistema de dos componentes *ssrAB*, que regula positivamente los genes de SPI-2, esencial para la replicación y sobrevivencia de *Salmonella* dentro de células epiteliales y macrófagos, y así para la infección sistémica (Bustamante et al., 2008; Martínez et al., 2014). El operón *flhDC*, que controla la expresión de los genes flagelares y quimiotaxis, es también regulado directamente por HilD, formando un circuito que interrelaciona la expresión de estos genes con los de SPI-1 (Singer et al., 2014). De esta forma, el regulón de HilD agrupa a un gran número de genes que contribuyen decisivamente a la patogenicidad de *Salmonella*.

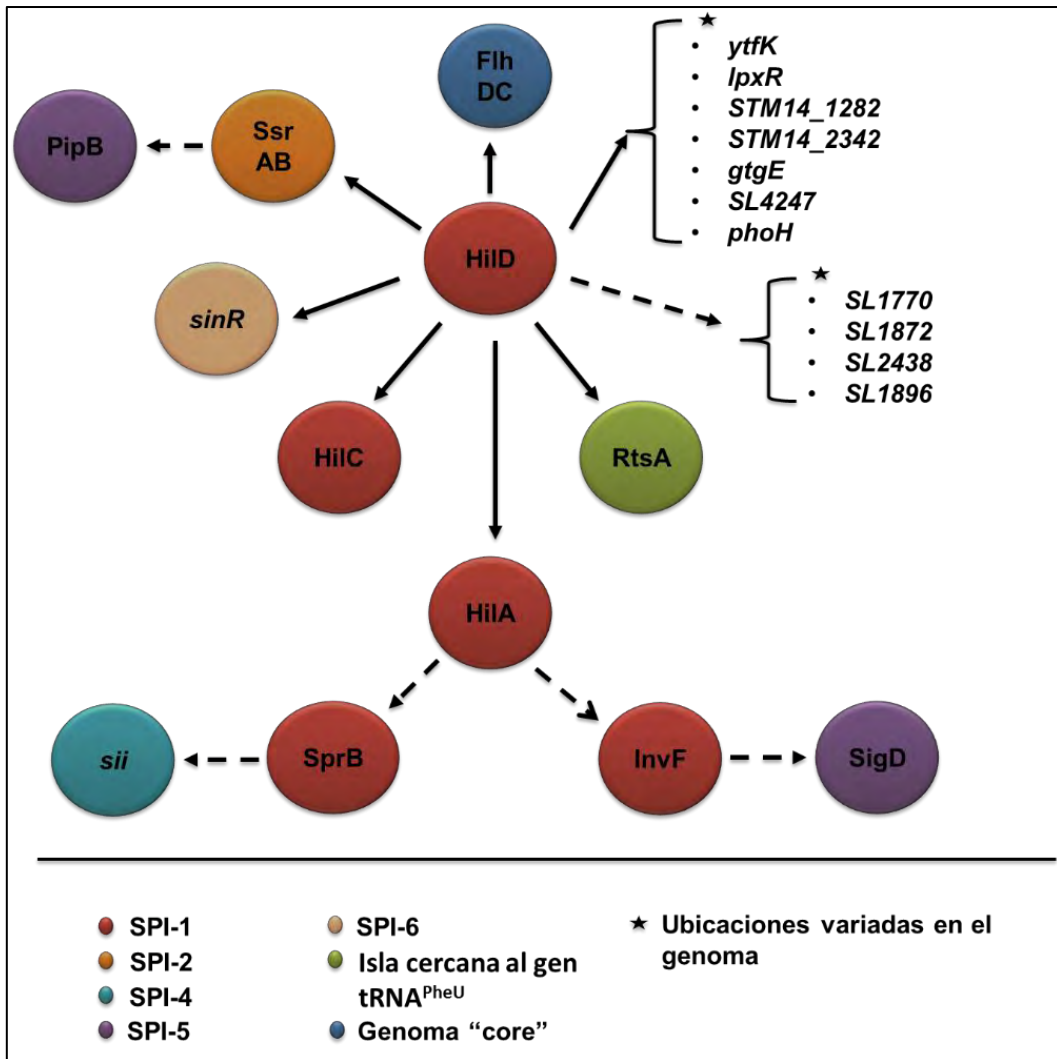


Fig. 4. Representación esquemática del regulón de HiID. Las flechas sólidas indican regulación directa de HiID. Las flechas punteadas indican regulación indirecta de HiID. En la parte inferior se indica la localización en el genoma de los componentes del regulón.

II. ANTECEDENTES

En nuestro grupo estamos interesados en la identificación de nuevos factores de virulencia de *Salmonella*. Ya que HilD coordina la expresión de una gran variedad de genes que hacen de *Salmonella* un patógeno intestinal, nos hemos dado a la tarea de identificar nuevos genes regulador por HilD, y definir si estos genes están involucrados en la virulencia de *Salmonella*.

En años recientes se han identificado nuevos genes de *S. Typhimurium* regulados por HilD, como son los casos de los genes *phoH* y *SL1896*. Para ello, se han realizado estudios globales de transcriptómica, ensayos *in silico* de coexpresión de genes y se ha analizado la expresión de fusiones transcripcionales de los genes blanco (Colgan et al., 2016; Martínez-Flores et al., 2016). Mediante ensayos de retardo en gel (EMSA) se pudo determinar que HilD regula directamente a *phoH* e indirectamente a *SL1896* (Martínez-Flores et al., 2016). *phoH* es un gen ancestral con un porcentaje de G+C de 50.7%, similar al del genoma de *S. Typhimurium* (52%). Fue primeramente descrito en *Escherichia coli* K12, aunque está ampliamente conservado entre muchas bacterias e incluso algunas archaea. Codifica para una proteína (PhoH) con actividad de unión a ATP y su expresión es regulada positivamente por el sistema de dos componentes PhoR/B, en respuesta a condiciones limitantes de fosfato (Kim et al., 1993). Se conoce que PhoH tiene homología con el dominio ATPasa N-terminal de la superfamilia I de helicasas (Koonin and Rudd, 1996). Sin embargo, hasta el momento no se conoce la función que desempeña este gen, sólo se sabe que no es esencial en *E. coli* K12 (Zhou et al., 2003). Fuera del sistema PhoR/B no se conocía de otro regulador involucrado en su expresión (como lo es ahora HilD en *S. Typhimurium*).

Por su parte, *SL1896* codifica para una proteína hipotética, de la cual solo se han encontrado ortólogos dentro del género *Salmonella* (*S. enterica* y *S. bongori*). En *S. Typhimurium*, este gen tiene solo 40.8% de G+C, lo que indica que fue adquirido mediante transferencia horizontal. En el contexto genómico, este gen se encuentra rodeado de un amplio grupo de genes flagelares (Figura 5). Sin embargo, la expresión de *SL1896* no se controla por FlhDC, el regulador maestro de los genes flagelares y quimiotaxis (Martínez-Flores et al., 2016).

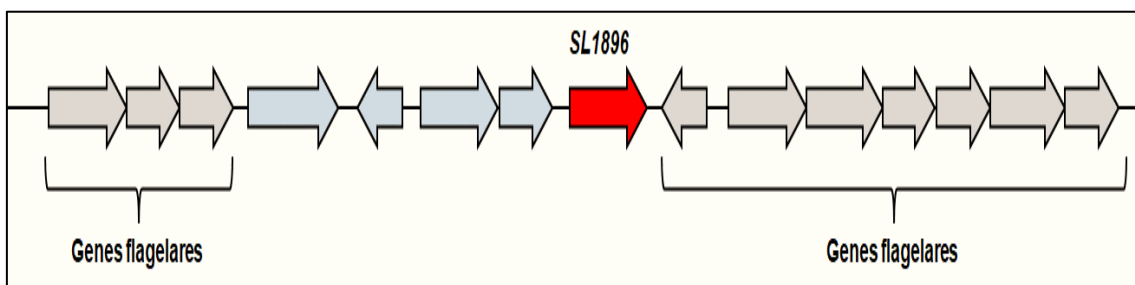


Fig. 5. El gen *SL1896* se encuentra en una región donde predominan genes flagelares. La flecha roja señala la posición del gen *SL1896*.

A medida que se ha ido estudiando el regulón de HilD se han encontrado nuevos genes involucrados en la virulencia de *Salmonella*. Con base en esto, planteamos que los genes *phoH* y *SL1896* podrían ser necesarios para el establecimiento de la infección por *Salmonella*. Por otro lado, al ser *phoH* un gen ancestral, pensamos que en *Salmonella* este gen se adaptó para ser regulado por HilD, mediante cambios en la secuencia de su región reguladora.

Así, en este proyecto nos planteamos las siguientes preguntas:

1. ¿Tienen *phoH* y *SL1896* algún papel en la virulencia de *Salmonella* Typhimurium?
2. ¿Cómo se adaptó la regulación de la expresión de *phoH* por HilD?

III. HIPÓTESIS

Los genes *phoH* y *SL1896* se requieren para la virulencia de *S. Typhimurium*; la expresión de *phoH* se adaptó para ser regulada por HilD mediante cambios en su región reguladora.

IV. OBJETIVOS

Generales.

1. Determinar si *phoH* y *SL1896* tienen una función en la virulencia de *Salmonella Typhimurium*.
2. Determinar cómo se adaptó la regulación de la expresión de *phoH* por HilD.

Específicos.

- Determinar si *phoH* y *SL1896* tienen alguna función en la invasión y replicación de *Salmonella Typhimurium* en células HeLa y macrófagos RAW264.7.
- Determinar si HilD regula la expresión del gen *phoH* de *E. coli* K-12.
- Comparar la secuencia de las regiones reguladoras de *phoH* de *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12.
- Determinar si el sistema PhoR/PhoB regula la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas, plásmidos, oligonucleótidos y antibióticos empleados en este trabajo se enlistan en las tablas 1, 2, 3 y 4.

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo

Cepa	Descripción	Origen o referencia
<u>S. Typhimurium:</u>		
WT	Cepa silvestre SL1344, Stp ^r	(Hoiseh and Stocker, 1981)
$\Delta phoH::km$	Derivada de SL1344; $\Delta phoH::km$, Stp ^r , Km ^r	Este trabajo
$\Delta SL1896::km$	Derivada de SL1344; $\Delta SL1896::km$, Stp ^r , Km ^r	Este trabajo
$\Delta phoB::km$	Derivada de SL1344; $\Delta phoB::km$, Stp ^r , Km ^r	Este trabajo
$\Delta ssrB::km$	Derivada de SL1344; $\Delta ssrB::km$, Str ^r , Km ^r	(Bustamante et al., 2008)
$\Delta hilD$	Derivada de $\Delta hilD::km$; Str ^r	(Bustamante et al., 2008)
$\Delta phoP::km$	Derivada de SL1344; $\Delta phoP::km$, Str ^r , Km ^r	(Banda et al., 2018)
$\Delta flhDC::km$	Derivada de SL1344; $\Delta flhDC::km$, Str ^r , Km ^r	(Martínez-Flores et al., 2016)
$phoH_{STm}$ -3XFLAG-km	Derivada de SL1344, expresa la proteína PhoH-FLAG, Str ^r , Km ^r	Este trabajo
$invF$ -3XFLAG-km	Derivada de SL1344, expresa la proteína InvF-FLAG, Str ^r , Km ^r	(Pérez-Morales et al., 2017)
<u>E. coli:</u>		

MG1655	Derivada de <i>E. coli</i> K-12, cepa silvestre de laboratorio	Colección del laboratorio
BW25131	Derivada de <i>E. coli</i> K-12, cepa silvestre de laboratorio	Colección del laboratorio
$\Delta phoH::km$	Derivada de BW25131; $\Delta phoH::km$, Km ^r	(Baba et al., 2006)
<i>PhoH_{Ec}-3XFLAG-km</i>	Derivada de MG1655, expresa la proteína PhoH-FLAG, Km ^r	Este trabajo
DH10 β	Cepa de laboratorio, Str ^r	Invitrogen
DH5 α	Cepa de laboratorio, Nal ^r	Invitrogen

Tabla 2. Plásmidos empleados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Origen o referencia
pKK232-8	Derivado de pBR322, contiene el gen <i>cat</i> (cloranfenicol acetil transferasa) sin promotor, empleado para la construcción de fusiones transcripcionales; Amp ^r	(Brosius, 1984)
pKD4	Derivado de pANTS γ , contiene el gen de resistencia a kanamicina, flanqueado por FRT's	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD46	Derivado de pINT-ts, contiene el sistema de recombinación del fago λ RED bajo el control de un promotor inducible por arabinosa; Amp ^r	(Datsenko and Wanner, 2000)
pSUB11	Derivado de pSU311, contiene la secuencia de tres epítopes consecutivos de FLAG; Km ^r	(Uzzau et al., 2001)
<i>pphoH_{STm}-cat</i>	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>phoH_{STm}-cat</i> , Amp ^r	(Martínez-Flores et al., 2016)

<i>p_{phoH}Ec-cat</i>	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>phoH_{Ec}-cat</i> , Amp ^r	Este trabajo
<i>ppstS_{STm}-cat</i>	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>pstS_{STm}-cat</i> , Amp ^r	Este trabajo

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Nombre	Secuencia (5'-3')	Modificación
Construcción de la mutante Δ<i>phoH</i>::km		
phoH-H1P1	GGC TTA CAA GGA AGC CAA CCC TCA GAT GTG TGT GCG CAT AAT <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u>	
phoH-H2P2	CGG GCT CTG AAA GTC AAT GCT ATA TTA GCT GTA TGC GTG AAG <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u>	
Verificación de la mutante Δ<i>phoH</i>::km		
phoH-Fw11	CGA <u>GGA TCC</u> CCC ATG ACG TCA TAT GTG GTG	<i>Bam</i> HI
phoH-Rv12	CGA <u>AAG CTT</u> AAT GAA TGC CCT GGA CAT GAC	<i>Hind</i> III
Construcción de la mutante Δ<i>SL1896</i>::km		
SL1896-H1P1	ATT TTT ACT CAC TGA CAT CAT CAG GTG ATG ATT TAT TTA TGC <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u>	
SL1896-H2P2	TGG GCT TAT TTT TGC GAG GCG CGC TCA TTT TAT TGA TAA GCG <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u>	
Verificación de la mutante Δ<i>SL1896</i>::km		
SL1896 Fw21	CGA <u>GGA TCC</u> TGA GCC GAT GAA AAA TCC AGG	<i>Bam</i> HI
SL1896 Rv22	CGA <u>AAG CTT</u> ATC AGG AAG TCA TGT CCA TGC	<i>Hind</i> III
Construcción de la mutante Δ<i>phoB</i>::km		
SphoB H1P1	CGA CTA ACA GGG CAA ATT ATG GCG AGA CGT ATT CTG GTC GTA <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u>	

SphoB H2P2	CAA CTG GCG GAA AAG GCA TTA AAA GCG GGT CGA AAA ACG ATA <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u>	
Verificación de la mutante $\Delta phoB::km$		
phoB-Fw61	CGA <u>GGA TCC</u> GTC ATA AAT CTG ACG CAT AAT GG	<i>Bam</i> HI
phoB-Rv62	CGA <u>AAG CTT</u> CTC CCT CAA GAA TGG AAA GCC	<i>Hind</i> III
Verificación de mutantes (Datsenko and Wanner, 2000)		
k1	CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT	
k2	CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC	
Construcción de la fusión $phoH_{Ec}$-cat		
phoH-Fw41	CGA <u>GGA TCC</u> TGG ATA TGG GGT TGC TGT TTG	<i>Bam</i> HI
phoH-Rv42	CGA <u>AAG CTT</u> CAT GGA GAG CAC CTT GAG TTG	<i>Hind</i> III
Construcción de la fusión $pstS_{Stm}$-cat		
pstSFw71	CGA <u>GGA TCC</u> CTC TTT GTC CTG GCG ATC CC	<i>Bam</i> HI
pstSRv72	CGA <u>AAG CTT</u> GAA CAG GCC TTC CTG ATT CAG	<i>Hind</i> III
Verificación de fusiones en pKK232-8		
PKKSEQ1-VB	CAA CGG TGG TAT ATC CAG TG	
PKKSEQ2-VB	GAG GCC CTT TCG TCT TCA AG	
Construcción de $phoH_{Stm}$-3XFLAG-km		
phoHSTmFlagFw	GCG CTC GGC GCT TTG TCA GCG AAC GCT TCA CGC ATA CAG <u>CGA CTA CAA AGA CCA TGA CGG T</u>	
phoHSTmFlagRv	ACA AAG CCC GGT TTC CCG GGC TCT GAA AGT CAA TGC TAT <u>ACA TAT GAA TAT CCT CCT TAG TTC</u>	
Construcción de $phoH_{Ec}$-3XFLAG-km		
phoHEcFlagFw	ACG TTC GGC ACT TTG CCA ACG TAC GCT GCA TGC CTA CAG <u>TGA CTA CAA AGA CCA TGA CGG T</u>	
phoHEcFlagRv	ACA AAG CCC GGT TCG CCC GGG CTC TGC ACC GAT AAC ACA <u>CCA TAT GAA TAT CCT CCT TAG TTC</u>	

Verificación de <i>phoH_{STM}-3XFLAG-km</i>		
phoH-Fw11	CGA <u>GGA TCC</u> CCC ATG ACG TCA TAT GTG GTG	<i>Bam</i> HI
phoH-Rv12	CGA <u>AAG CTT</u> AAT GAA TGC CCT GGA CAT GAC	<i>Hind</i> III
Verificación de <i>phoH_{Ec}-3XFLAG-km</i>		
phoH-Fw41	CGA <u>GGA TCC</u> TGG ATA TGG GGT TGC TGT TTG	<i>Bam</i> HI
phoHRv43	CGA <u>AAG CTT</u> CAC AGG ATG AGC GTA CAC TTC	<i>Hind</i> III

Tabla 4. Antibióticos empleados en este estudio

Antibiótico	Dosis
Estreptomina (Str)	100 µg/mL
Ampicilina (Amp)	200 µg/mL
Gentamicina (Gen)	10 y 50 µg/mL
Kanamicina (Km)	20 g/mL

5.1. Purificación de plásmidos por Miniprep

Se prepararon inóculos con las cepas que contienen los plásmidos de interés, en 5 mL de medio LB con los antibióticos para los que presentan resistencia (Tabla 4), se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm.

Al día siguiente se obtuvo una pastilla de bacterias concentrando todo el cultivo, centrifugando sucesivamente durante 2 min a 13,000 rpm. La pastilla se resuspendió en 150 µL de buffer SET, se agregaron 8 µL de RNasa (10 mg/mL) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Enseguida se agregaron 400 µL de solución de lisis (NaOH 0.2 M/SDS 1%) y se mezcló. Transcurridos los 5 min de incubación en hielo se agregaron 300 µL de acetato de amonio 7.5 M pH

7.8 y se mezcló, se incubó durante 10 min en hielo. Después se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se agregaron 500 μL de isopropanol, se agitó y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Enseguida se centrifugaron las muestras durante 10 min a 14,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó en las condiciones anteriores y se desechó el sobrenadante. Las muestras se secaron bien y se resuspendieron en 50 -100 μL de agua milli Q.

5.2. Preparación de células electrocompetentes

Se prepararon inóculos de las cepas de interés en 5 mL de medio LB con los antibióticos para los que presentan resistencia y se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm. El día posterior se transfirió 1 mL del inóculo a un matraz de 250 mL con 100 mL de medio LB adicionado con los antibióticos adecuados. Los matraces se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm hasta obtener una DO_{600} de 0.6-0.8. El cultivo se transfirió a tubos Nalgene de 50 mL, se centrifugaron durante 8min a 8,000 rpm a 4°C y se desechó el sobrenadante. Enseguida se lavó la pastilla con 40 mL de agua milli Q estéril previamente enfriada, se centrifugó en las condiciones anteriores y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, se agregaron 40 mL de glicerol al 10% estéril previamente enfriado, se centrifugó en las condiciones anteriores y se desechó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 200-400 μL de glicerol al 10% estéril.

5.3. Electroporación

Se colocaron en hielo las celdas de electroporación (BIORAD). Enseguida se agregaron en un tubo Eppendorf, 5 μL del plásmido con el que se transformó (1.8-2 μL para la fusión transcripcional *phoH_{Ec-cat}*) y 50 μL de células

electrocompetentes, se mezclaron y se colocaron en la celda de electroporación. A continuación, se le dio un pulso eléctrico de 2.5 kV durante 5.5 ms empleando un electroporador “*E. coli* pulser” (BIORAD). Posteriormente, se agregó 1 mL de medio SOC a la celda, se mezcló y se transfirió a un tubo de ensayo, se incubaron los tubos con cultivo durante una hora a 37°C en agitación de 200 rpm. Enseguida se tomaron 250 µL del cultivo y se sembraron en cajas Petri con medio LB solidificado con agar al 1.5% con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C durante aproximadamente 16 horas.

5.4. Construcción de cepas mutantes $\Delta phoH::km$, $\Delta SL1896::km$ y $\Delta phoB::km$

La mutagénesis por PCR se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Datsenko y Wanner; 2000. La estrategia consiste en sustituir los genes que se desean mutar (*SL1896*, *phoH* y *phoB*) con un gen seleccionable de resistencia a kanamicina que es generado por PCR, utilizando oligonucleótidos que tienen 42 nucleótidos homólogos al gen que se desea remover (H1 y H2). En este procedimiento, la recombinación requiere la recombinasa del fago λ RED, la cual es sintetizada bajo el control de un promotor inducible por arabinosa en un plásmido de bajo número de copias (pKD46).

Se amplificó el gen de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4 empleando los oligonucleótidos que proveen la región homóloga al gen de interés (oligonucleótidos H1P1/H2P2) (Tabla 3). Se realizaron 5 reacciones de PCR y se juntaron en un solo tubo Eppendorf. Se agregaron 100 µL de acetato de amonio pH 7.8, 300 µL de fenol y 300 µL de cloroformo alcohol isoamílico. Después se mezcló y se centrifugó durante 5min a 14,000 rpm. Transcurridos los 5min se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregaron 500 µL de

cloroformo alcohol isoamílico. Enseguida se mezcló y se centrifugó en las condiciones anteriores y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregó 1 mL de alcohol absoluto se agitó y se dejó precipitando durante toda la noche a -20°C o bien a -70°C durante 1 hora. Al día siguiente (o transcurrida una hora), se centrifugaron los tubos durante 30 min a 14,000 rpm. Enseguida se desechó el etanol absoluto, se agregó 1 mL de etanol al 70%, se mezcló y se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm. Después se desechó el sobrenadante, se secaron durante 15 min con calor medio en Speedvac sc100 (Savant). Las pastillas se resuspendieron en 16 μL de agua y se observó en un gel de agarosa al 1%.

Se realizó un pre-inóculo de la cepa *S. Typhimurium* SL1344/ pKD46 en cajas de LB con ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 30°C . Al día siguiente se inocularon de 20-40 colonias en 25 mL de medio SOB más 25 μL de ampicilina y 2.5 mL de L-+-arabinosa 1 M, ya que el plásmido pKD46 tiene promotor inducible por arabinosa. Después se incubó a 30°C en agitación a 200 rpm hasta obtener una DO_{600} de 0.6, se centrifugó durante 10 min a 8,000 rpm a 4°C , se lavó 3 veces la pastilla en 1 mL de agua fría centrifugando durante 5 min a 8,000 rpm a 4°C , se resuspendió la pastilla en 100 μL de agua fría.

De los 100 μL de células electrocompetentes se tomaron 50 μL y se electroporaron con 3-6 μL del producto de PCR concentrado. Enseguida se agregó 1 mL de medio SOC y se incubaron los tubos de ensayo durante 3 horas a 30°C (temperatura a la cual se replica el plásmido pKD46) en agitación a 200 rpm. Transcurridas las 3 horas de incubación se sembraron 200 μL en LB agar con kanamicina y se incubaron las cajas a 37°C (temperatura a la cual se pierde el plásmido pKD46) durante toda la noche. El resto del cultivo se dejó a

temperatura ambiente. En caso de no haber obtenido colonias, el resto del cultivo se sembró en LB agar más kanamicina y se incubó a 42°C toda la noche (para asegurar que se perdiera el plásmido pKD46).

De las colonias que presentaron resistencia a kanamicina, pero sensibilidad a ampicilina, ya que el plásmido pKD46 tiene un casete de resistencia a este antibiótico, se purificó DNA total. Enseguida se realizó la caracterización, amplificando por PCR con los oligonucleótidos diseñados para este fin (Tabla 3), los fragmentos correspondientes al gen de interés y al casete de kanamicina en la cepa de *S. Typhimurium* silvestre y sus respectivas mutantes. Después se seleccionó la colonia donde su producto de PCR en un gel de agarosa 1% mostrara el tamaño correspondiente al casete de kanamicina. Los productos de PCR seleccionados fueron enviados a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, para verificar su secuencia nucleotídica.

5.5. Construcción de cepas *phoH_{STm}-3XFLAG-km* y *phoH_{Ec}-3XFLAG-km*

Para etiquetar el gen *phoH* de *S. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* K-12 a tres epítopes FLAG (3XFLAG), se procedió como lo describen Uzzau et al., 2001. Esta técnica se basa en la mutagénesis a partir de productos de PCR, ideada por Datsenko y Wanner (2000), la cual se describe en el acápite 5.4, y a la cual se le realizaron algunas modificaciones. En este caso se utilizaron oligonucleótidos con homología a la última región del gen (oligonucleótidos Fw) y a otra secuencia corriente abajo del mismo (oligonucleótidos Rv) (Tabla 3). Estos oligonucleótidos también tienen homología con regiones del plásmido pSUB11, que se utiliza como templado para amplificar la etiqueta 3XFLAG unida al gen de resistencia a kanamicina (3XFLAG-km). Una vez que se obtienen los

productos de PCR se procede de la misma manera que en el acápite 5.4, pero en esta ocasión se seleccionan al final aquellas cepas cuyos productos de PCR correspondan al tamaño de la etiqueta 3XFLAG-km.

5.6. Ensayo de invasión a células epiteliales y macrófagos RAW264.7

El ensayo se realizó como se ha descrito previamente (Ibarra et al., 2010; Pérez-Morales et al., 2017; Steele-Mortimer et al., 1999), empleando células HeLa (células epiteliales cervicales humanas) y macrófagos RAW264.7. Las células se sembraron en placas de 24 pozos (Costar 3524, Corning Incorporated ®) conteniendo medio DMEM con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (By Productos), de 20 a 24 horas antes de la infección para permitir su adhesión. Se colocaron las placas con las células en una incubadora humidificada 37°C, 5% de CO₂. Se agregaron 1×10^5 células /pozo (1 mL/pozo) con una confluencia de 75-90%. Para la preparación de las bacterias, se estriaron las cepas evaluadas en cajas de LB con los antibióticos adecuados para obtener colonias aisladas. Se tomó una colonia y se colocaron pre-inóculos en 3 mL de LB con los antibióticos adecuados, se incubaron de 16-18 horas a 37°C con agitación de 200 rpm.

Transcurrido ese tiempo, se transfirieron 600 µL de los pre-inóculos en matraces con 20 mL de LB sin antibióticos y se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm, hasta alcanzar una D.O₆₀₀ de 0.6-0.7 (dilución 1:4). Una vez que las bacterias alcanzaron la D.O₆₀₀ se centrifugó 1 mL de cultivo durante 2 min a 8,000 x g, a temperatura ambiente. Enseguida se removieron cuidadosamente 900 µL del sobrenadante sin deshacer la pastilla celular. Después se resuspendieron las pastillas en 900 µL de PBS estéril 1X, se realizó una dilución 1:10 y 1:40 en DMEM, para infectar las células HeLa y los macrófagos

respectivamente. Se continuó añadiendo 10 μ L de las diluciones anteriores, a cada uno de los pozos con el cultivo celular correspondiente, se movió la placa para mezclar (este fue el tiempo 0). Enseguida se incubó la placa a 37°C, 5% CO₂ durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se retiró el DMEM de cada uno de los pozos y se lavaron las monocapas de células 2 veces adicionando 1 mL de PBS estéril 1X a cada pozo, se agitó cuidadosamente la placa y se retiró el PBS. Una vez removido el PBS, se adicionó 1 mL de DMEM pre-calentado a 37°C en cada pozo, entonces se incubó la placa a 37°C, 5% CO₂ durante 20 min. Transcurridos los 20 min, se eliminó el DMEM de cada pozo y se agregó 1 mL de DMEM suplementado con gentamicina (50 μ g/mL) para eliminar las bacterias que no invadieron. Enseguida se incubó la placa a 37°C, 5% CO₂ durante 1 hora. Después de este tiempo, se lavaron las monocapas de células 2 veces adicionando 1 mL de PBS estéril 1X a cada pozo. Se agitó cuidadosamente la placa y se removió el PBS. Enseguida se lisaron las monocapas de células adicionando solución de lisis (deoxicolato de sodio 0.2% en PBS 1X) recién preparada, 1 mL para las células HeLa y 200 μ L para los macrófagos; se pipeteó la solución sobre las capas de células de 2-3 veces e inmediatamente se transfirió el contenido a tubos Eppendorf estériles, a partir de los cuales se realizaron diluciones seriales (1:10, 1:100 y 1:1000) en PBS estéril 1X. Se continuó plaqueando 10 μ L de cada dilución y de la solución directa sobre cajas Petri con LB (5 repeticiones para obtener un promedio). Estas cajas se incubaron a 37°C. Al siguiente día se contaron las colonias y los cálculos de las UFCs/mL se hicieron tomando en cuenta los factores de dilución.

5.7. Ensayo de sobrevivencia y replicación en células epiteliales y macrófagos RAW264.7

Se sigue la misma metodología que para el ensayo de invasión a células epiteliales HeLa y macrófagos RAW264.7, hasta la hora de incubación con gentamicina (50 µg/mL); que cuenta como la primera hora del ensayo. Transcurrido este tiempo, se removió el medio y se sustituyó por DMEM con gentamicina (10 µg/mL). De inmediato se incubó a 37°C, 5% CO₂ durante 7 y 15 horas, para completar tiempos de replicación de 8 y 16 horas respectivamente. Pasado los tiempos indicados, se lisó, plaqueó y contaron las UFCs/mL de igual manera que para el ensayo de invasión. Las veces de replicación se calcularon dividiendo las UFCs/mL (8 y 16 horas) entre las UFCs/mL (1 hora).

5.8. Ensayo de movilidad en agar

Las cepas estudiadas (Tabla 1) se cultivaron en 5 mL de medio LB con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C con agitación 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente se tomaron 50 µL de los cultivos y se inocularon en 5 mL de LB y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 1.0. Muestras de los cultivos (1 µL) fueron sembradas picando el medio LB con agar al 0.3%. Las cajas Petri se incubaron 6 horas a 37°C y a partir de las 4 horas se midieron los halos de movilidad alrededor del inóculo (cm).

5.9. Construcción de las fusiones transcripcionales

Para la construcción del plásmido que contiene la fusión transcripcional *phoH_{Ec}-cat*, primero se amplificó por PCR la región reguladora del gen, empleando los respectivos oligonucleótidos descritos en la Tabla 3 y el DNA cromosomal de *E. coli* K-12 como templado. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% con solución amortiguadora TAE (Tris-Acetato-EDTA 0.5X, pH 8.0) a 110 V. Se tiñó el gel con bromuro de etidio (0.5 µL/mg) y se observó el DNA teñido en

un transiluminador de luz UV de onda corta (Sigma). Se cortó la banda correspondiente al tamaño de la región amplificada y se purificó con el kit “Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit” (ZYMO RESEARCH). Una vez purificado el DNA, se digirió, al igual que el plásmido pKK232-8 (contiene al gen *cat* sin promotor), con las enzimas de restricción correspondientes, BamHI-HindIII. Las digestiones se purificaron con el kit “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche) y se observaron en un gel de agarosa al 1%. Con base en lo observado se colocó para la ligación, la cantidad necesaria del plásmido pKK232-8 y del fragmento de DNA amplificado, de forma tal que se obtuviera una relación de 5:1 molar. Para esta reacción, se mezcló el fragmento de DNA que nos interesaba clonar y el fragmento de DNA del vector linearizado y se incubó a 22°C durante 10 min con la enzima ligasa T4. Después se inactivó la enzima a 65°C por 10 min. Se tomaron entre 1.8-2 µL de las reacciones de ligación para transformar por electroporación las cepas *E. coli* DH10 β y *E. coli* DH5α.

Se confirmó que el plásmido pKK232-8 tuviera el fragmento *phoH_{Ec}*, mediante su purificación de varias colonias de las transformantes por miniprep. Los plásmidos purificados se corrieron en un gel de agarosa al 1% y se seleccionó uno de los que se vio que contenía el inserto, éste se purificó por columna con el kit “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche) y se obtuvo la secuencia nucleotídica en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

5.10. Cultivos bacterianos para la cuantificación de la expresión de genes

Se llevó a cabo como lo detalla Martínez et al., 2011.

- Preparación de muestras de cultivos bacterianos en LB

Se crecieron inóculos de las cepas transformadas, en 5 mL de medio LB con los antibióticos para los que presentan resistencia, se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm. Se transfirieron 500 µL de los inóculos a matraces de 250 mL con 50 mL de medio LB adicionados con los antibióticos adecuados (se realizó por duplicado). Se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm y se tomaron muestras de 1 mL a la hora 4 y 9 de incubación. Se centrifugaron las muestras durante 2 min a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Enseguida se lavaron las pastillas con 650 µL de solución de lavado TDDT (Tris-HCl, pH 7.8 50 mM, y DL-ditiotreitol 30 µM), se centrifugaron en las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante.

En caso de no llevar a cabo el ensayo inmediatamente, se guardaron las pastillas a -20°C, de lo contrario se resuspendieron en 800 µL de TDDT.

- Preparación de muestras de cultivos bacterianos en MM-N

Se realizaron los inóculos de la misma forma que para el medio LB donde las cepas transformadas se colocaron en 5 mL de medio LB con los antibióticos para los que presentan resistencia. Después se incubaron durante toda la noche a 37°C en agitación a 200 rpm. Al día siguiente se transfirió 1 mL de los tubos de ensayo a tubos Eppendorf estériles, se centrifugaron durante 2 min a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se lavaron las pastillas con 1 mL de medio MM-N, se centrifugaron en las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante. Enseguida se resuspendieron las pastillas en 500 µL de medio MM-N, los cuales se transfirieron a matraces de 250 mL con 50 mL de medio MM-N adicionados con los antibióticos adecuados (se realizó por duplicado). Se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante 15 horas y en este punto se

tomaron dos muestras de 1.5 mL, las cuales se centrifugaron durante 2 min a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Después se lavaron las pastillas en 650 μ L de solución de lavado TDTT, se centrifugaron en las mismas condiciones y se desechó el sobrenadante. En caso de no llevar a cabo el ensayo inmediatamente, se guardaron las pastillas a -20°C , de lo contrario se resuspendieron en 800 μ L de TDTT.

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

La cuantificación de la actividad específica de la enzima CAT se realizó utilizando una modificación de un método espectrofotométrico descrito previamente por Puente et al., 1996. Las pastillas resuspendidas en TDTT se sonicaron durante 3 min en un sonicador "Vibra Cell", con pulsos de 10 s y períodos de reposo de 10 s entre cada pulso, el tiempo total de sonicación fue de 6 min. Una vez sonicadas las muestras, se centrifugaron durante 15 min a 13,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a tubos limpios.

La cuantificación de proteínas totales en el sobrenadante se realizó en placas de cultivo celular de 96 pozos (Costar) donde se agregó a cada pozo por duplicado 10 μ L de muestra y 10 μ L de solución de lavado TDTT como blanco, cada una en su lugar correspondiente. A continuación, se agregaron 200 μ L de la mezcla de los reactivos BCA en una proporción 50:1, BCA "Protein Assay Reagent" (Pierce). Se incubaron las placas a 37°C durante 30 min. La lectura de absorbancia se realizó a 562 nm en un lector automatizado de microplacas tipo CERES 900 C (Bio-Tek Instruments Inc.), con el programa KC4. Los valores obtenidos se interpolaron en una curva estándar de BCA (albúmina de suero bovino) (mg/mL) ya cargada en el sistema.

La cuantificación de CAT se llevó a cabo colocando en otras placas de cultivo celular de 96 pozos (Costar) 5 μ L de muestra en cada pozo por duplicado, y 200 μ L de la mezcla de reactivos Tris-HCl pH 7.8 concentración 0.1 M, DNTB (ácido 5, 5' ditio-bis (2-nitrobenzoico) 1 mM (Research Organics), acetil-CoA 0.1 mM (Pharmacia Biotech) y cloranfenicol 0.1 mM (Sigma). Se midió la absorbancia a 404 nm cada 5 s durante 5 min de reacción, en el mismo lector automatizado de microplacas y con el programa KC4, los resultados se interpolan en una curva estándar de CAT (0-2,500 U/mL) almacenada en el programa.

El cálculo de la actividad específica de CAT (μ mol/min/mg) se realizó al dividir la actividad de CAT entre la concentración de proteínas totales.

5.12. Inmunodetección de proteínas mediante “Western blot”

Se desarrolló como lo detalla Martínez et al., 2011. Muestras de 1.0 y 1.5 mL de cultivo de medio LB y MM-N respectivamente, se centrifugaron durante 2 min a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas de bacterias obtenidas fueron resuspendidas en 200 μ L de amortiguador de carga SDS-PAGE 1X. Estas muestras se calentaron a 95°C durante 5 min y se corrió en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%, usando amortiguador de corrida Tris-Glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0.1%). Este gel se utilizó para la transferencia a una membrana de nitrocelulosa de poro 0.45 μ m (Millipore), en una cámara de transferencia semi-seca (Bio-Rad), usando amortiguador de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20%, SDS 0.04%) durante 45 min a 15 V. Las membranas que contenían las proteínas transferidas fueron bloqueadas con leche desgrasada al 5% en PBST (PBS 1X, Tween 20 0.03%) durante una hora. Posteriormente la membrana se incubó en agitación durante toda la noche con los anticuerpos monoclonales anti-FLAG M2 (SIGMA) o anti-

GroEL (StressGen), diluidos en PBST 1: 2,000 y 1: 50,000 respectivamente. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó 3 veces con PBST en agitación durante 15 min. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo (1:10,000) (PIERCE) para detectar a los anticuerpos anti-GroEL y anti-FLAG. Las membranas se mantuvieron en agitación durante dos horas. Se realizaron de nuevo 3 lavados durante 15 min con PBST en agitación. A continuación, se agregó una mezcla 1:1 de los reactivos para revelado “enhanced luminol reagent” y “oxidizing reagent” del estuche comercial para revelado “Western Lightening Chemiluminiscense Reagent Plus” (Perkin Elmer Life Sciences) y se dejaron reaccionar durante 1 minuto. Finalmente, las membranas se expusieron en películas radiográficas (KODAK-Omat-LS-film).

5.13. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con el programa GraphPad Prism 6 versión 6.01 (GraphPad Inc., San Diego, CA) utilizando un ensayo *t*-Student's desapareado.

VI. RESULTADOS

6.1. Construcción de las mutantes de *S. Typhimurium* $\Delta phoH::km$ y $\Delta SL1896::km$.

Para investigar si los genes *phoH* y *SL1896* están involucrados en la virulencia de *Salmonella*, se obtuvieron mutantes de *S. Typhimurium* con la remoción de estos genes, las cuales se denominaron $\Delta phoH::km$ y $\Delta SL1896::km$.

Las mutantes fueron creadas siguiendo la metodología descrita por Datsenko and Wanner, 2000, como se describe en Materiales y Métodos y se esquematiza en la Figura 6

Las cepas mutantes generadas se caracterizaron por PCR con distintos juegos de oligonucleótidos (Tabla 3) que permiten diferenciar a las cepas mutantes de la cepa silvestre (Figura 6). En la figura 7 se muestran los productos de PCR obtenidos para la cepa silvestre y las respectivas mutantes. Los pares de oligonucleótidos *phoH*-Fw11 + *phoH*-Rv12 y *SL1896* Fw21 + *SL1896*-Rv22 flanquean a los genes *phoH* y *SL1896*, respectivamente. Por lo que, en las mutantes $\Delta phoH::km$ y $\Delta SL1896::km$, al amplificar con las respectivas combinaciones de oligonucleótidos Fw y Rv, obtuvimos fragmentos de aproximadamente 1500 pb que incluyen al casete de kanamicina (1476 pb), mientras que en la cepa silvestre se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 1000 pb para *phoH* y 500 pb para *SL1896*, que corresponden a los tamaños esperados para los genes silvestres.

Los oligonucleótidos k1 y k2 hibridan con regiones específicas del casete de kanamicina (Figura 6C). Al realizar los PCR con los oligonucleótidos Fw + k1 y

k2 + Rv, se obtuvieron fragmentos de alrededor de 500 pb y 700 pb para la mutante $\Delta phoH::km$, respectivamente, y de alrededor de 400 pb y 700 pb para la mutante $\Delta SL1896::km$, respectivamente; productos que corresponden a los tamaños esperados. En la cepa silvestre no hubo amplificación ya que no presenta el casete de kanamicina (Figura 7). Después de obtener las mutantes, se enviaron a secuenciar los productos de PCR obtenidos con las combinaciones de oligonucleótidos Fw y Rv de cada gen, y se pudo comprobar la mutación de cada uno de los genes.

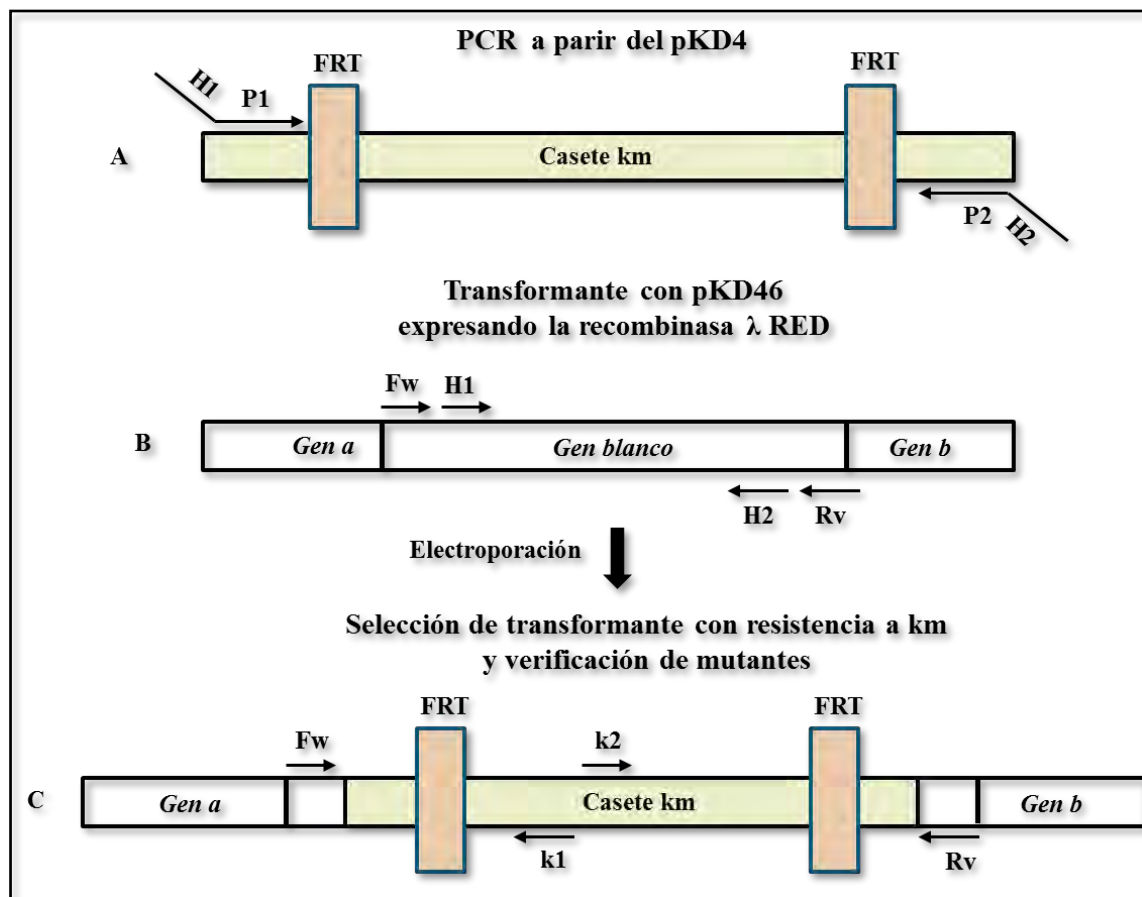


Fig. 6. Construcción de cepas mutantes $\Delta phoH::km$ y $\Delta SL1896::km$ por el método de mutagénesis sitio dirigida usando productos de PCR. (A) Se obtienen productos de PCR del casete de resistencia a kanamicina, empleando oligonucleótidos H1/P1 y H2/P2 (Tabla 3). Además, se transforma la cepa de *S. Typhimurium* con el plásmido pKD46 que expresa la recombinasa del fago λ RED. (B) La cepa *S. Typhimurium* + pKD46 se electropora con los productos de PCR. (C) Se seleccionan las mutantes por su resistencia a kanamicina (el plásmido pKD46 (Amp^r), se pierde al cultivar a 37 y 42°C) y los patrones de bandas de los productos de PCR con los oligonucleótidos Fw/Rv, Fw/k1 y k2/Rv para cada gen (Tabla

3). Las mutantes se verificaron también por secuenciación con los oligonucleótidos Fw y Rv para cada gen.

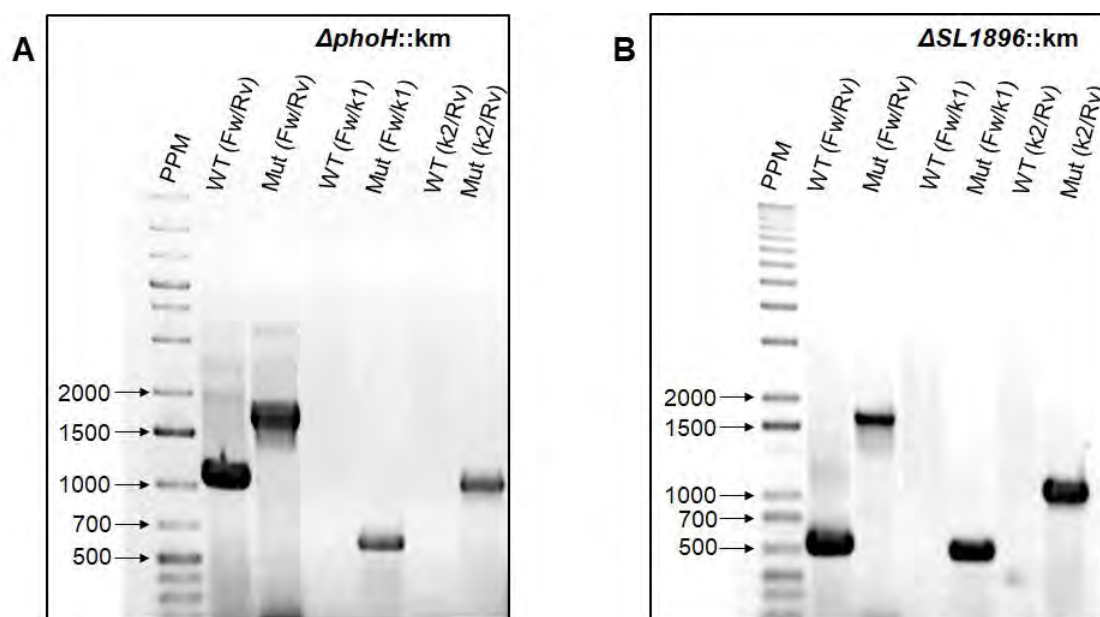


Fig. 7. Caracterización por PCR de las cepas mutantes *S. Typhimurium* $\Delta phoH::km$ y $\Delta SL1896::km$. Patrón de bandas de la mutante (A) *phoH* y (B) *SL1896*. Las cepas mutantes se verificaron realizando un PCR con los oligonucleótidos *phoH*-Fw11/*phoH*-Rv12 para *phoH*, y *SL1896*-Fw21/*SL1896*-Rv22 para *SL1896* (Tabla 3). También se utilizaron los oligonucleótidos k1 y k2 (Tabla 3), que hibridan con regiones específicas del casete de kanamicina. Las combinaciones usadas fueron Fw/k1 y k2/Rv para ambos genes. Los patrones de bandas se compararon contra los de la cepa silvestre *S. Typhimurium* 1344, en un gel de agarosa 1%. Con los oligonucleótidos Fw/Rv se obtuvieron los fragmentos de mayor talla en las mutantes. Estos oligonucleótidos flanquean los genes blanco, que en las mutantes están sustituidos por el casete de kanamicina, que al ser mayor que los dos genes, amplifica fragmentos de mayor talla que en la cepa control, que amplifica los genes silvestres. Con los oligonucleótidos Fw/k1 y k2/Rv solo se observa amplificación en las mutantes, ya que presentan el casete de kanamicina. Los fragmentos se corresponden con las tallas esperadas según las distancias de las secuencias con las que hibridan los oligonucleótidos empleados.

6.2. Los genes *phoH* y *SL1896* no están implicados en la invasión de *S. Typhimurium* a células HeLa o macrófagos

HilD es el principal activador de genes que son necesarios para la invasión de *Salmonella* a sus células hospedadoras (Ellermeier et al., 2005; Saini et al., 2010). Así, para investigar si *phoH* y *SL1896* se requieren para la virulencia de *Salmonella*, comenzamos por analizar si las mutantes $\Delta phoH::km$ y

$\Delta SL1896::km$ están afectadas en la invasión a células HeLa y macrófagos RAW264.7.

Se realizaron ensayos de invasión con la cepa silvestre, $\Delta phoH::km$ y $\Delta SL1896::km$. Como controles positivo y negativo, se analizaron también las mutantes $\Delta ssrB::km$ y $\Delta hilD$ respectivamente; SsrB induce la expresión de los genes de SPI-2, requeridos para la replicación y sobrevivencia dentro de las células hospederas, pero no para la invasión. Como se muestra en la figura 8, las mutantes $\Delta phoH::km$ y $\Delta SL1896::km$ invadieron a las células HeLa y macrófagos RAW264.7 de manera similar a la cepa silvestre. Como esperábamos, la mutante $\Delta hilD$, pero no la mutante $\Delta ssrB::km$, mostró una drástica disminución de la invasión en ambas líneas celulares (Figura 8). Estos resultados indican que los genes *phoH* y *SL1896* no son requeridos para la invasión de *Salmonella* a células HeLa y macrófagos.

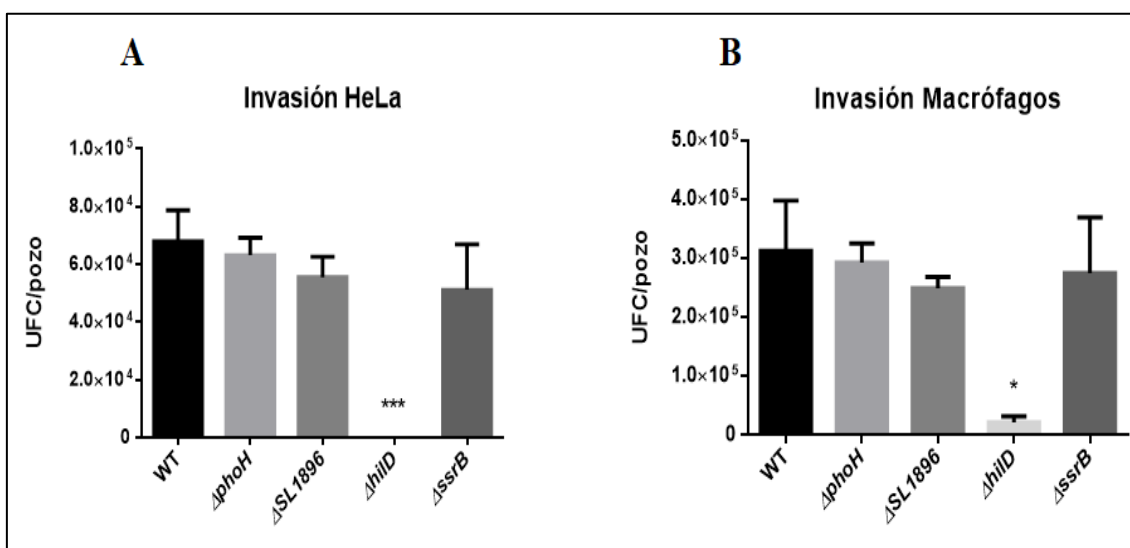


Fig. 8. *phoH* y *SL1896* no se requieren para la invasión de *S. Typhimurium* a células HeLa y macrófagos. Se infectaron células HeLa y macrófagos RAW264.7 con las cepas WT, $\Delta phoH::km$, $\Delta SL1896::km$, $\Delta hilD$ y $\Delta ssrB::km$. Después de una hora de la infección, las células se lisaron y las bacterias intracelulares se recuperaron en cajas con medio LB +

Str para su posterior conteo. La invasión se expresa como unidades formadoras de colonias por pozo (UFC/Pozo). Las barras representan las desviaciones estándar. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas (****p < 0.05).

6.3. El gen *SL1896*, pero no *phoH*, parece estar implicado en la replicación y sobrevivencia de *S. Typhimurium* dentro de macrófagos

Una característica importante en la patogénesis de *Salmonella enterica* es lograr replicarse y sobrevivir dentro de sus células huésped. Para ello, se induce la expresión de los genes de SPI-2 y de otros genes relacionados (Fàbrega and Vila, 2013). Se ha demostrado que HilD regula positivamente la expresión del sistema de dos componentes SsrA/B, principal activador de los genes de SPI-2, lo cual crea una interconexión entre SPI-1 y SPI-2 (Bustamante et al., 2008). Así, investigamos si la ausencia de *phoH* o *SL1896* afecta la replicación y sobrevivencia intracelular de *S. Typhimurium* en células HeLa y macrófagos RAW264.7.

Se realizaron ensayos de replicación/sobrevivencia con las cepas silvestres, $\Delta phoH::km$ y $\Delta SL1896::km$, determinando el número de bacterias intracelulares, en células HeLa y macrófagos RAW264.7, después de 16 horas de la infección. Como control negativo, se analizó también la mutante $\Delta ssrB::km$. En la figura 9A se observa que las mutantes $\Delta phoH::km$ y $\Delta SL1896::km$ lograron replicarse/sobrevivir a niveles similares a los de la cepa silvestre en células HeLa a las 16 horas. Estos resultados indican que ni *phoH* ni *SL1896* son necesarios para la replicación/sobrevivencia de *S. Typhimurium* dentro de células epiteliales. Sorpresivamente, en macrófagos observamos que la mutante $\Delta SL1896::km$, pero no $\Delta phoH::km$, logró replicarse/sobrevivir a niveles

significativamente mayores a los de la cepa silvestre (Figura 9B). En contraste, la mutante $\Delta ssrB::km$ mostró un fenotipo marcadamente afectado en replicación/sobrevivencia intracelular en ambas líneas celulares (Figura 9A y B). Estos resultados sugieren que el gen *SL1896*, pero no *phoH*, pudiera tener algún papel relacionado con la replicación/sobrevivencia intracelular de *S. Typhimurium* en macrófagos.

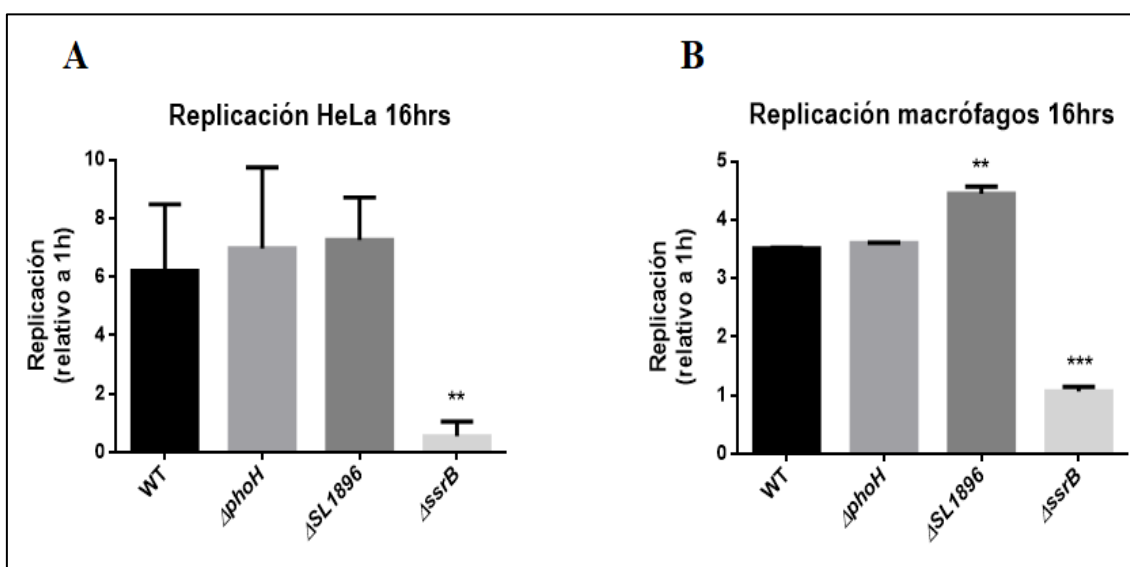


Fig. 9. *SL1896* parece tener un papel en la replicación y sobrevivencia de *S. Typhimurium* dentro de macrófagos. Se infectaron células HeLa y macrófagos RAW264.7 con las cepas WT, $\Delta phoH::km$, $\Delta SL1896::km$ y $\Delta ssrB::km$. Después de 16 horas de la infección, las células se lisaron y las bacterias intracelulares se recuperaron en cajas con medio LB + Str para su posterior conteo. La replicación se expresa como la cantidad de veces que se incrementó el número de unidades formadoras de colonias recuperadas con respecto a 1 hora de infección. Las barras representan las desviaciones estándar. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas (**** $p < 0.05$).

6.4. El gen *phoH* se requiere para la movilidad de *S. Typhimurium*

La movilidad por flagelo es necesaria para la interacción de *Salmonella* con células epiteliales (Fàbrega and Vila, 2013; Singer et al., 2014). Se ha descrito que HilD regula la expresión de FlhDC, el cual induce la expresión de los genes flagelares/quimiotaxis (Singer et al., 2014). Así, para investigar si los genes *phoH*

y *SL1896* están involucrados en la movilidad de *S. Typhimurium*, se analizó la movilidad de la cepa silvestre y de sus derivadas mutantes $\Delta phoH::km$ y $\Delta SL1896::km$ en placas de LB con agar suave. Como control negativo, se analizó también la mutante $\Delta flhDC::km$.

Se midió el diámetro del halo de difusión de las cepas a las horas 4, 5 y 6 después de la inoculación. En todos los tiempos evaluados la mutante $\Delta phoH::km$ mostró una movilidad disminuida, con respecto a la cepa silvestre y a la mutante $\Delta SL1896::km$, las cuales presentaron una movilidad similar (Figura 10). Como esperábamos, la mutante $\Delta flhDC::km$ no presentó movilidad (Figura 10). Estos resultados sugieren que el gen *phoH*, pero no *SL1896*, desempeña alguna función relacionada a la movilidad en *S. Typhimurium*.

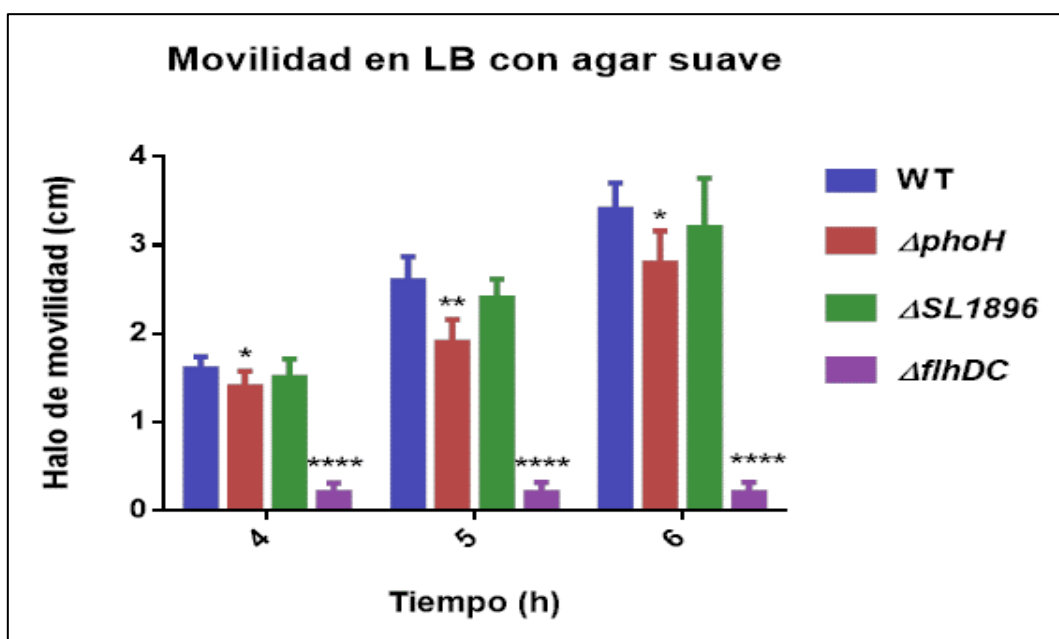


Fig. 10. *phoH*, pero no *SL1896*, se requiere para la movilidad de *S. Typhimurium*. Comparación de los halos de movilidad en agar suave de las cepas WT, $\Delta phoH::km$, $\Delta SL1896::km$ y $\Delta flhDC::km$. Las cepas se inocularon picando las placas de LB con agar al 0.3% y se incubaron a 37°C durante 6 horas. Se hicieron mediciones de los halos de difusión a las 4, 5 y 6 horas. Las barras representan las desviaciones estándar. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas (**** $p < 0.05$)

6.5. La secuencia de la región intergénica corriente arriba de *phoH* es diferente en *S. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* K-12

El gen *phoH* se encuentra en muchas bacterias, incluyendo a *E. coli* K-12 (Martínez-Flores et al., 2016). La secuencia nucleotídica de *phoH* y su correspondiente secuencia de aminoácidos está altamente conservada en *S. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* K-12, tienen 82% y 93 % de identidad, respectivamente. En contraste, la secuencia de la región intergénica corriente arriba de *phoH* es diferente en *S. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* K-12, en tamaño y secuencia (Figura 11). En *S. Typhimurium* esta región es de 927 pb, mientras que en *E. coli* K-12 es de 345 pb; asimismo, sólo un segmento de 95 pb de esta región tiene una identidad alta (80%) entre *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12 (Figura 11A y B). Se han descrito dos inicios de transcripción en *phoH* tanto en *S. Typhimurium* como en *E. coli* K-12 (Colgan et al., 2016), sugiriendo la presencia de dos promotores en este gen (Figura 11A y B). La región corriente arriba de *phoH* que se conserva en *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12, solamente contiene el segundo inicio de la transcripción (Figura 11A y B). En *E. coli* K-12, el primer promotor (inicio de transcripción 1) se induce bajo condiciones limitantes de fosfato, dependiente del sistema de dos componentes PhoR/PhoB, mientras que el segundo promotor (inicio de transcripción 2) se expresa constitutivamente (Kim et al., 1993). Usando el programa Softberry se pueden identificar los sitios de unión del regulador PhoB en la secuencia corriente arriba de *phoH* de *E. coli* K-12 (demostrados experimentalmente) (Figura 11B), pero no se pueden predecir sitios de unión de PhoB en la secuencia correspondiente de *phoH* de *S. Typhimurium* (Figura 11A). Un análisis comparativo similar, realizado con *hfq* y

ompR, dos genes ancestrales al igual que *phoH*, reveló que tanto la secuencia de los genes estructurales, como la secuencia de las regiones intergénicas corriente arriba del respectivo gen, está altamente conservada ($\geq 87\%$ de identidad) en *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12 (Figura 12). Así, estos resultados indican una alta variación en la secuencia de la región corriente arriba de *phoH*, entre *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12, lo cual no es un fenómeno generalizado entre los genes que comparten estas bacterias.

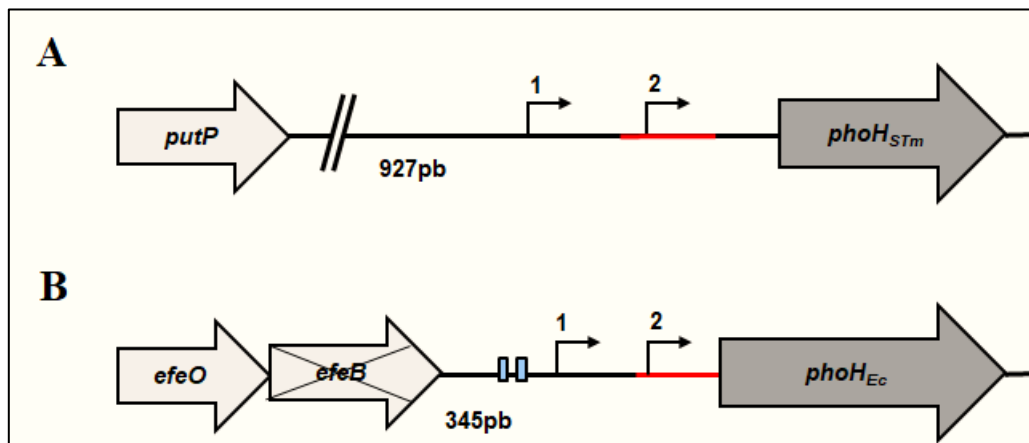


Fig. 11. Las secuencias intergénicas corriente arriba de *phoH* en *S. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* K-12 son diferentes. (A) Representación de *phoH* de *S. Typhimurium* SL1344. (B) Representación de *phoH* de *E. coli* K-12. Marcado en rojo se muestran las secuencias que en las regiones intergénicas corriente arriba son idénticas en ambos genes (80%). Los cuadros azules muestran los sitios de pegado del regulador PhoB a *phoH* de *E. coli* K-12. Las flechas señalan los sitios de inicio de la transcripción (1 y 2). Debajo de la región intergénica corriente arriba de cada gen se muestra su tamaño en pares de bases (pb). La figura no se encuentra a escala.

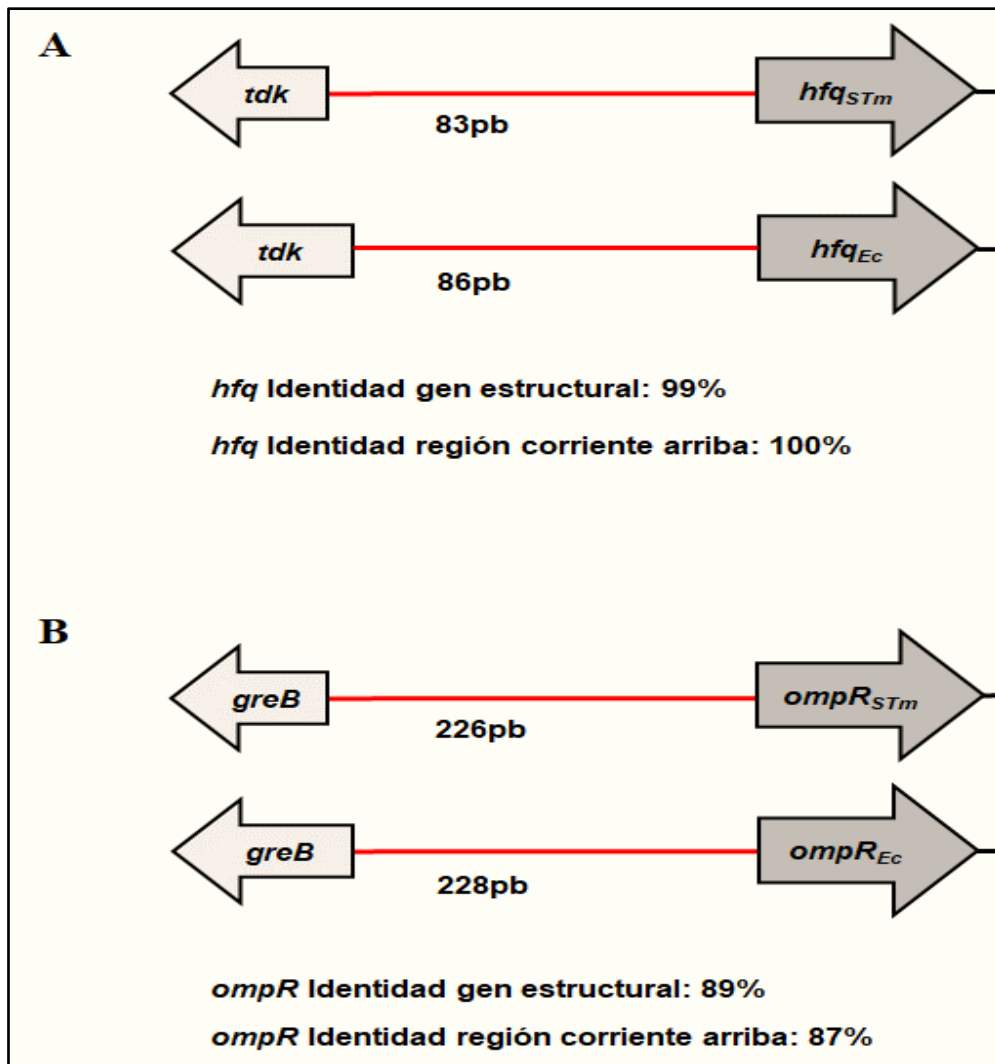


Fig. 12. Los genes ancestrales *hfq* y *ompR* están conservados en *S. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* K-12. (A) Representación del gen *hfq* en *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12. (B) Representación del gen *ompR* en *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12. Debajo de la región corriente arriba de cada gen se muestra su tamaño en pares de base (pb). La figura no se encuentra a escala.

6.6. La expresión del gen *phoH* de *S. Typhimurium*, pero no del gen *phoH* de *E. coli* K-12, se induce en LB por HiID

Las diferencias que presenta la secuencia de la región corriente arriba de *phoH* de *S. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* K-12 podrían haber generado que en *S. Typhimurium* la expresión de este gen se controle diferente, como lo indica su regulación por HiID. Para investigar más a fondo esto, primeramente analizamos

si HilD es capaz de regular a *phoH* de *E. coli* K-12. Para ello se determinó la expresión de fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* de *phoH* de *S. Typhimurium* SL1344 (*phoH_{STm}-cat*) y de *phoH* de *E. coli* K-12 (*phoH_{Ec}-cat*), en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y su derivada mutante Δ *hilD*, así como en la cepa silvestre de *E. coli* K-12, crecidas en LB. Como se muestra en la figura 13A, el nivel mayor de expresión alcanzado por la fusión *phoH_{STm}-cat* fue en la cepa silvestre de *S. Typhimurium*. Consistente con nuestros resultados anteriores (Martínez-Flores et al., 2016), la expresión de esta fusión disminuyó en la mutante Δ *hilD* y en la cepa silvestre de *E. coli* K-12, aunque no se abatió por completo en estas dos cepas (Figura 13A). Estos resultados muestran la regulación positiva de la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium* por HilD, cuando se crecen a las bacterias en LB. Interesantemente, la fusión *phoH_{Ec}-cat* mostró un muy bajo nivel de expresión en las tres cepas probadas (Figura 13B), indicando que el crecimiento de las bacterias en LB no favorece la expresión de *phoH* de *E. coli* K-12. Para confirmar los resultados anteriores, se etiquetó a las proteínas PhoH de *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12 con el epítotope 3XFLAG, para detectar su expresión, a partir del respectivo gen cromosomal, mediante ensayos de Western blot. En estos ensayos se detectó la expresión de PhoH-3XFlag en *S. Typhimurium*, pero no en *E. coli* K-12, creciendo a las bacterias en LB (Figura 13D), lo cual es consistente con los resultados obtenidos con las fusiones transcripcionales probadas. Por otro lado, como control de nuestro experimento se analizó la expresión de una fusión del gen *pstS* de *S. Typhimurium* al gen reportero *cat* (*pstS_{STm}-cat*). El gen *pstS* codifica la proteína PstS, una de las subunidades de un transportador transmembranal de fosforo inorgánico altamente eficiente. Este gen está ampliamente conservado en muchas

bacterias, incluyendo *E. coli* K-12. Los genes *pstS* de *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12 presentan una alta homología en su región intergénica corriente arriba y estructural (80% y 86% respectivamente) (Figura 14); y su expresión se activa en condiciones limitantes de Pi mediante el sistema de dos componentes PhoR/B (Lubin et al., 2016; Marzan and Shimizu, 2011). Cabe hacer notar que en *E. coli* K-12, la expresión de *phoH* también se activa en condiciones limitantes de Pi mediante el sistema de dos componentes PhoR/B, como se verá más adelante. Como se muestra en la figura 13C, la fusión *pstS_{STM}-cat* mostró un muy bajo nivel de expresión en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y su derivada mutante Δ *hilD*, así como en la cepa silvestre de *E. coli* K-12, crecidas en LB (Figura 13C). En conjunto, nuestros resultados indican que la variación en la secuencia corriente arriba de *phoH*, entre *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12, determina que la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium*, pero no *phoH* de *E. coli*, se induzca por el crecimiento de las bacterias en LB. La expresión de *phoH* de *S. Typhimurium* en LB, se debe en parte a la regulación positiva de este gen por HilD; sin embargo, el hecho de que la expresión de la fusión *phoH_{STM}-cat* no se disminuya por completo en la mutante Δ *hilD* y en *E. coli* K-12, podría sugerir un factor adicional involucrado en la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium*, presente tanto en *S. Typhimurium* como en *E. coli* K-12; alternativamente, esto podría estar relacionado a la fuerza intrínseca basal del promotor de *phoH* de *S. Typhimurium*.

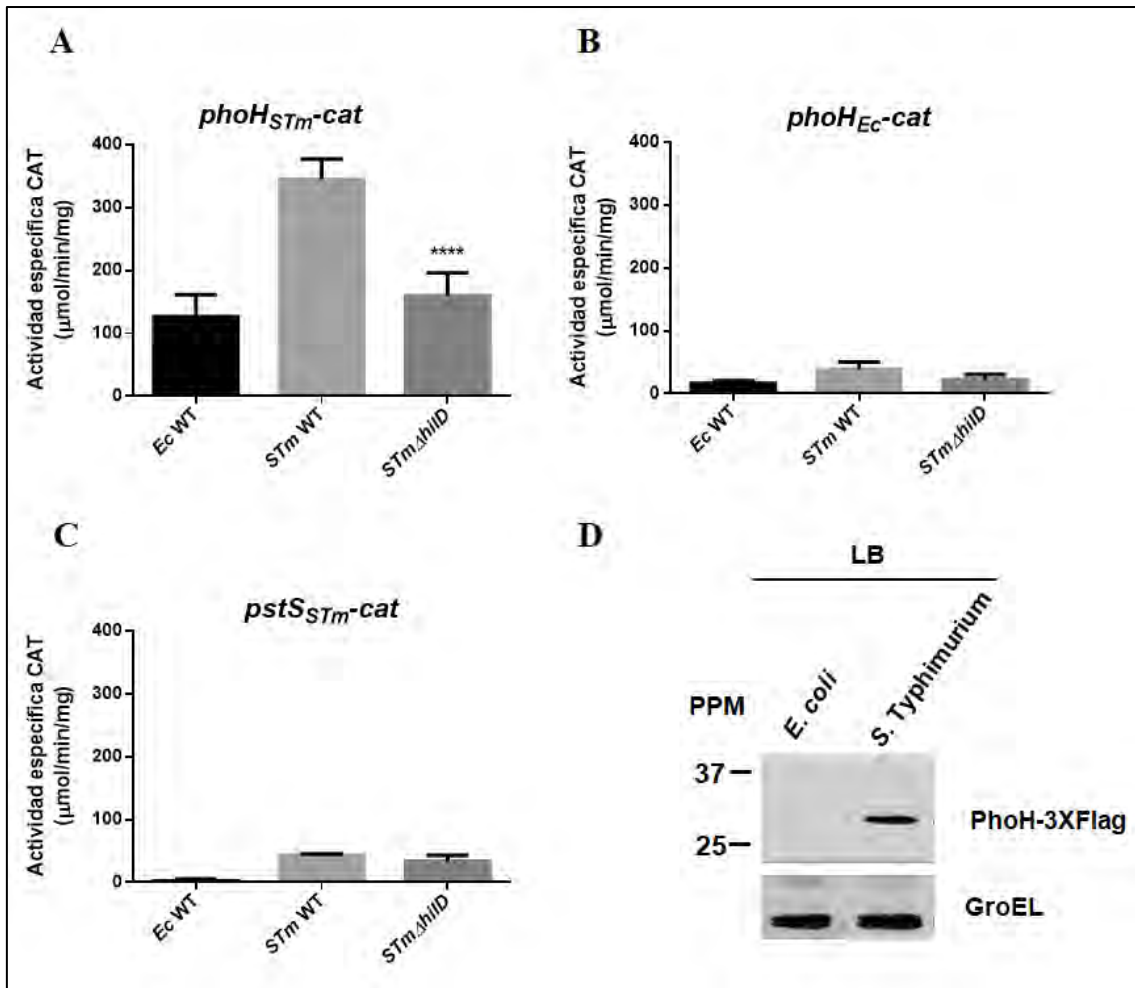


Fig. 13. La expresión de *phoH* de *S. Typhimurium* SL1344, pero no de *phoH* de *E. coli* K-12, se induce en LB. La expresión de las fusiones transcripcionales *phoH_{STm}-cat* (A), *phoH_{Ec}-cat* (B) y *pstS_{STm}-cat* (C) se determinó en las cepas WT de *E. coli* K-12 y *S. Typhimurium* y en *S. Typhimurium* Δ *hilD*, crecidas en medio LB a 37°C. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 9 horas. Los datos son el promedio de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras representan las desviaciones estándar. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas (**** $p < 0.05$). (D) Se analizó por Western blot la expresión cromosomal de PhoH-3XFLAG en *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12 en LB a 37°C, utilizando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Las muestras fueron tomadas en las mismas condiciones que los ensayos de expresión de las fusiones transcripcionales. Como control de carga se determinó la expresión de GroEL utilizando anticuerpos policlonales anti-GroEL. Se señala el patrón de peso molecular (PPM) en kDa.

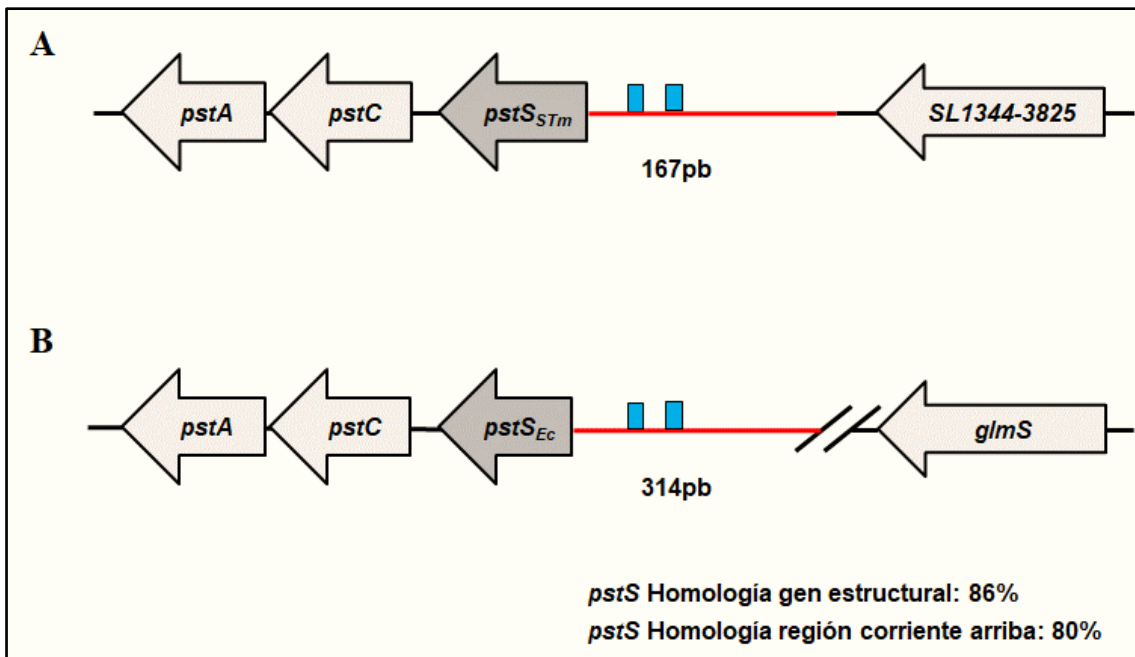


Fig. 14. El gen *pstS* está conservado en *S. Typhimurium* SL1344 y *E. coli* K-12. (A) Representación del gen *pstS* de *S. Typhimurium*. (B) Representación del gen *pstS* de *E. coli* K-12. Marcado en rojo se muestran las secuencias que en las regiones intergénicas corriente arriba son homólogas en ambos genes. Los cuadros azules muestran los sitios de pegado del regulador PhoB a la región corriente arriba de ambos genes. Debajo de la región corriente arriba de cada gen se muestra su tamaño en pares de base (pb). La figura no se encuentra a escala.

6.6.1. La expresión del gen *phoH* de *S. Typhimurium* responde a niveles de Pi de manera independiente de PhoB

En *E. coli* K-12, la expresión de *phoH*, así como de *pstS*, se induce en condiciones limitantes de Pi por el sistema de dos componentes PhoR/B. Para saber si la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium* también se regula por PhoR/B, en respuesta a bajo Pi, se determinó la expresión de la fusión *phoH_{STm}-cat* en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en su derivada mutante Δ *phoB*::km, crecidas en medio mínimo M (MM-N) con bajo y alto fósforo. Como control se analizó la expresión de la fusión *phoH_{Ec}-cat* en la cepa silvestre de *E. coli* K-12 y en su derivada mutante Δ *phoB*::km. La expresión de la fusión *phoH_{STm}-cat*, en la cepa

silvestre de *S. Typhimurium*, se indujo en condiciones de bajo Pi. Interesantemente, la inducción por bajo Pi de esta fusión no se afectó en la mutante $\Delta phoB::km$ (Figura 15A). Como controles de estos experimentos, la expresión de la fusión $phoH_{STM-cat}$ se analizó también en la mutante $\Delta hilD$ y como pudiera esperarse, la fusión $phoH_{STM-cat}$ mostró un perfil de expresión similar al de la cepa silvestre debido a que HilD no se expresa en las condiciones de crecimiento probadas (Figura 15A). Por otro lado, como era esperado, la expresión de la fusión $phoH_{Ec-cat}$ se indujo en la cepa silvestre de *E. coli* K-12, en condiciones de bajo Pi; asimismo, en la mutante $\Delta phoB::km$ de *E. coli* se afectó la inducción de la fusión $phoH_{Ec-cat}$, en respuesta a bajo Pi (Figura 15B). Como un control adicional, se analizó la expresión de la fusión $pstS_{STM-cat}$ en las cepas silvestres de *S. Typhimurium* y de *E. coli* K-12, así como en sus derivadas mutantes $\Delta phoB::km$. Tal como esperábamos, la expresión de la fusión $pstS_{STM-cat}$ se indujo en las cepas silvestres de *S. Typhimurium* y de *E. coli* K-12, pero no en sus derivadas mutantes $\Delta phoB::km$, en respuesta a bajo Pi (Figura 15C y D).

En conjunto, estos resultados muestran que la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium* se induce en respuesta a una baja concentración de fosfato, pero de manera independiente del regulador PhoB, lo cual es diferente a la regulación de este gen en *E. coli* K-12. En contraste, la expresión de *pstS* de *S. Typhimurium* sí se regula positivamente por PhoB, en respuesta a una baja concentración de fosfato, al igual que en *E. coli*. Así, la variación en la secuencia corriente arriba de *phoH*, entre *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12, generó también que la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium* se regule por la concentración de fosfato a través de un regulador aún no identificado.

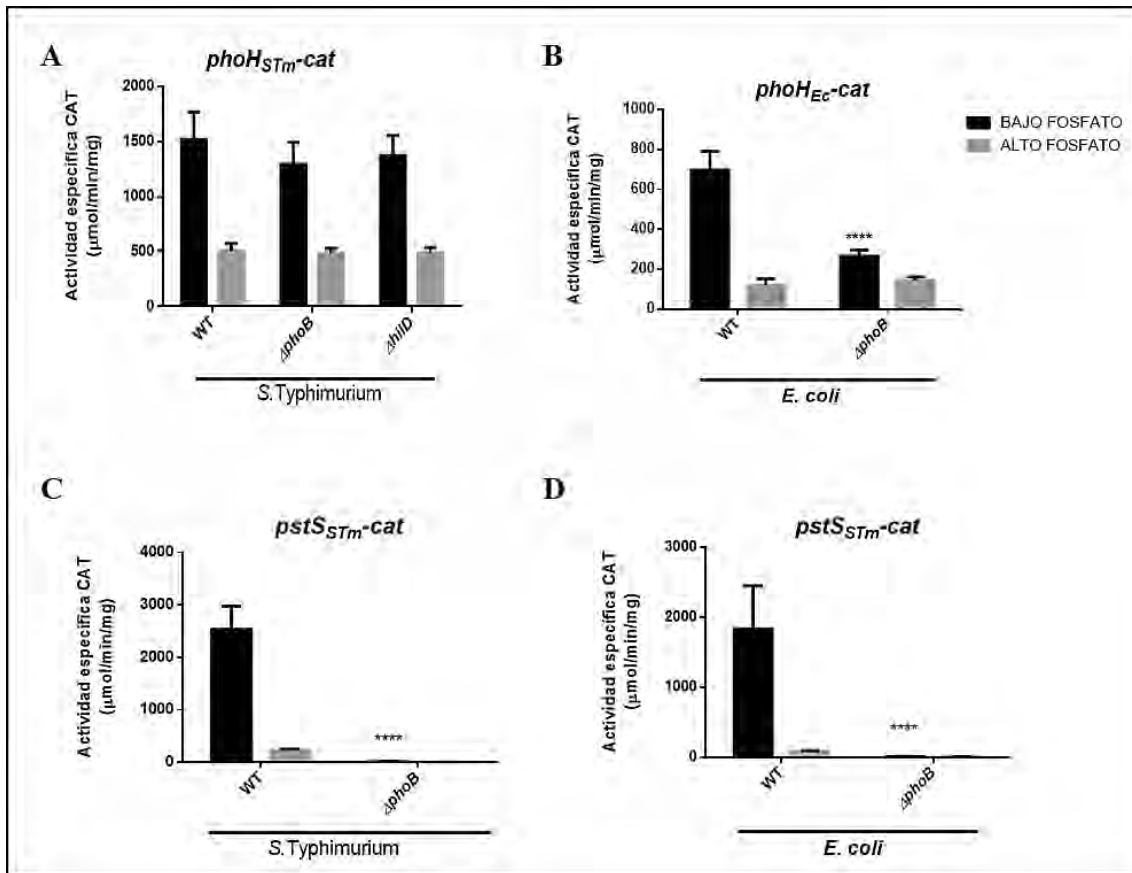


Fig. 15. *phoH* responde a niveles de Pi en *S. Typhimurium* de manera independiente de PhoB. La expresión de la fusión transcripcional *phoH_{STm}-cat* (A) se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium* y sus derivadas mutantes $\Delta phoB::km$ y $\Delta hiiD$. La expresión de la fusión transcripcional *phoH_{Ec}-cat* (B) se determinó en la cepa WT de *E. coli* K-2 y su derivada mutante $\Delta phoB::km$. La expresión de la fusión transcripcional *pstS_{STm}-cat* se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium* y su derivada mutante $\Delta phoB::km$ (C) y en la cepa WT de *E. coli* K-12 y su derivada mutante $\Delta phoB::km$ (D). La actividad específica de CAT se determinó a partir de muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos en medio mínimo N (MM-N) con bajo y alto fosfato, durante 16 horas a 37°C. Los datos son el promedio de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras representan las desviaciones estándar. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas (**** $p < 0.05$).

6.6.2. PhoP y SsrB no están involucrados en la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium*

Se ha visto que el regulón de PhoB en *E. coli*, incluido *phoH*, también se activa en condiciones de pH ácido (Marzan and Shimizu, 2011). Por otro lado, los

reguladores de respuesta PhoP y SsrB de *Salmonella*, los cuales forman parte de los sistemas de dos componentes PhoQ/P y SsrA/B, respectivamente, son activos en condiciones de bajo fosfato y pH ácido (Fàbrega and Vila, 2013). Por tal motivo, pensamos que PhoP o SsrB podrían estar involucrados en la expresión del *phoH* de *S. Typhimurium* en respuesta a bajo Pi. Para investigar esto, se determinó la expresión de la fusión *phoH_{STM}-cat* en la cepa silvestre de *S. Typhimurium* y en sus derivadas mutantes $\Delta phoP::km$ y $\Delta ssrB::km$, crecidas en MM-N (Figura 16). El patrón de expresión de la fusión *phoH_{STM}-cat* fue similar en las tres cepas probadas, indicando que PhoP y SsrB no están involucrados en la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium* en las condiciones de crecimiento analizadas.

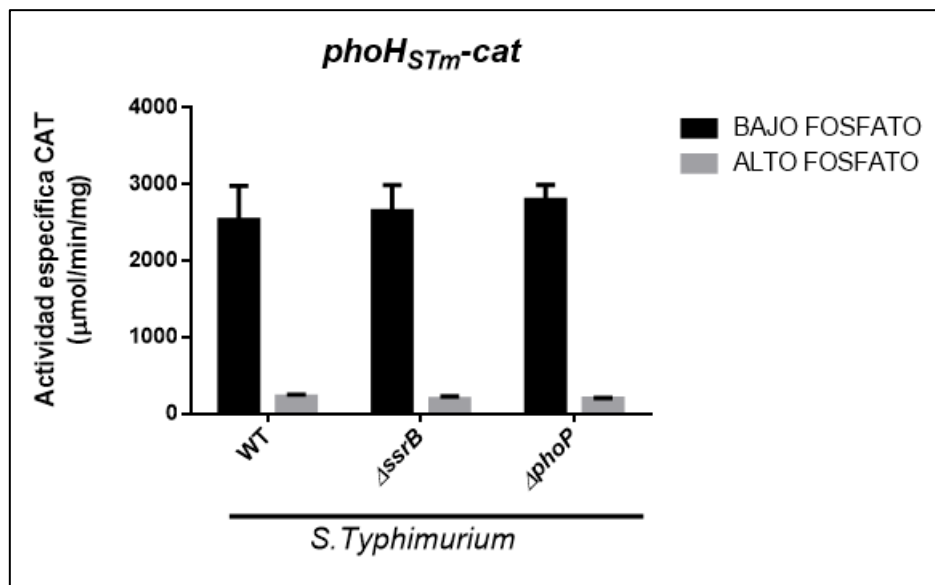


Fig. 16. PhoP y SsrB no regulan la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium* en medio mínimo. La expresión de la fusión transcripcional *phoH_{STM}-cat* se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y en sus derivadas mutantes $\Delta phoP::km$ y $\Delta ssrB::km$ en medio mínimo N (MM-N) con bajo y alto fosfato a 37°C. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 16 horas. Los datos son el promedio de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras representan las desviaciones estándar. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas (****p < 0.05).

VII. DISCUSIÓN

El regulón de HilD comprende muchos genes que están implicados en varias funciones de virulencia en *Salmonella*. La mayoría de estos genes están involucrados en la invasión de células hospederas; sin embargo, algunos se requieren también para la movilidad o la sobrevivencia intracelular (Bustamante et al., 2008; Fàbrega and Vila, 2013; Martínez-Flores et al., 2016; Singer et al., 2014).

Recientemente, en nuestro grupo se encontraron nuevos genes regulados por HilD, entre estos, *phoH* y *SL1896* (Martínez-Flores et al., 2016). Con base a su regulación por HilD, pensamos que los genes *phoH* y *SL1896* podrían estar involucrados en la virulencia de *Salmonella*. Así, en este trabajo generamos cepas de *S. Typhimurium* que carecen de *phoH* o *SL1896* y analizamos si estas cepas mutantes están afectadas en algunos fenotipos de virulencia, como la capacidad de invadir o replicarse dentro de células hospederas, así como la movilidad. Nuestros resultados indican que los genes *phoH* y *SL1896* no son requeridos para la invasión *in vitro* de *S. Typhimurium* a células HeLa o macrófagos RAW264.7, ni para su replicación dentro de células HeLa. Asimismo, nuestros resultados muestran que el gen *phoH* no se requiere para la replicación de *S. Typhimurium* dentro de macrófagos y que el gen *SL1896* no está involucrado en la movilidad de esta bacteria en las condiciones probadas. Interesantemente, nuestros resultados sugieren que en ausencia del gen *SL1896* se incrementa la replicación de la bacteria en macrófagos respecto a la cepa silvestre y que la cepa mutante de *phoH* presenta un fenotipo afectado en movilidad.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, nuestra hipótesis es que la función del gen *SL1896* puede estar relacionada con el control de los niveles de replicación intracelular de *S. Typhimurium* dentro de macrófagos. Esta función es muy importante, debido a que una sobrepoblación de bacterias en el interior de los macrófagos pudiera desencadenar una excesiva respuesta inmune, que conllevaría a la muerte de los mismos. A su vez, esto impediría que *S. Typhimurium* pueda diseminarse a través de los macrófagos y causar una infección sistémica. Además, utilizando el software bioinformático SMART se predice una región transmembranal hacia el extremo amino en la proteína *SL1896*. Por tal motivo, creemos que quizás esta proteína se ancle a la membrana de *S. Typhimurium*, o sea secretada al interior de los macrófagos, enviando algún tipo de señal que induzca el control de la población bacteriana.

Por otra parte, se ha demostrado que la proteína PhoH de *E. coli* K-12 tiene actividad de unión de ATP y homología al dominio ATPasa N-terminal de la superfamilia I de helicasas (Kim et al., 1993). Por su parte, la proteína PhoH de *S. Typhimurium* tiene una identidad de 93% respecto a la proteína de *E. coli* K-12, por lo que creemos que presentan las mismas actividades. Teniendo en cuenta lo anterior, nuestra opinión es que la posible función de la proteína PhoH de *S. Typhimurium* en la movilidad, es brindar energía a este proceso mediante la hidrólisis de ATP. Sin embargo, para confirmar los posibles papeles de los genes *SL1896* y *phoH* en replicación en macrófagos y movilidad, respectivamente, es necesario complementar las mutantes y observar que se restablezcan los fenotipos silvestres. Asimismo, se requiere analizar el papel de *SL1896* y *phoH* durante la infección de *S. Typhimurium* a modelos animales, como ratones o pollos. El empleo de este tipo de ensayos ha posibilitado

determinar funciones muy específicas de algunos factores de virulencia, como lo es en la competencia que se establece entre *Salmonella* y la microbiota intestinal (Sana et al., 2016), proceso que no se puede analizar mediante ensayos en cultivos celulares.

El gen *phoH* es un gen ancestral, es decir se encuentra en las dos especies de *Salmonella*, *enterica* y *bongori*, pero también en otras bacterias, como *E. coli*, donde el regulador HilD no está presente. Esto indica que la regulación de *phoH* por HilD se adaptó durante la evolución de *Salmonella*. Así, en este trabajo nos planteamos investigar cómo se estableció la regulación de *phoH* por HilD; si al adquirirse HilD éste reconoció sitios en la región reguladora de *phoH*, o si durante la divergencia de *Salmonella* de *E. coli* se fueron acumulando cambios en la secuencia de la región reguladora de *phoH*, lo cual generó sitios de reconocimiento de HilD. En ambos casos, la regulación de *phoH* por HilD tuvo que proporcionar una ventaja adaptativa a *Salmonella* para permanecer. A este respecto, encontramos que el gen estructural *phoH* está altamente conservado (82% de identidad) entre *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12. En contraste, la secuencia de la región reguladora de *phoH* es sustancialmente diferente entre *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12, en cuanto a longitud y secuencia (sólo se conserva un segmento de 95 pb, con una identidad de 80%). Nuestros resultados indican que la expresión del gen *phoH* de *S. Typhimurium* se induce por el crecimiento en LB, mediante su regulación por HilD y posiblemente otro factor aún desconocido; en contraste, el gen *phoH* de *E. coli* no se expresa en LB, aún en presencia de HilD. Así, nuestro estudio indica que las diferencias en la secuencia de la región reguladora de *phoH* de *S. Typhimurium*, con respecto al de *E. coli* K-12, generaron una nueva conexión reguladora en *phoH* de *S.*

Typhimurium, en la cual HilD induce la expresión de este gen en condiciones de crecimiento favorables para la expresión de los genes de SPI-1 y varios otros genes de virulencia de *Salmonella*, como lo es el crecimiento en el medio rico en nutrientes LB (Figura 17).

Es ampliamente conocido el impacto que tienen la transferencia horizontal de genes y las mutaciones en secuencias codificantes de proteínas, sobre la evolución de la patogenicidad en bacterias. Sin embargo, se conoce poco sobre la importancia de las mutaciones en las secuencias reguladoras que actúan en *cis*, en la patogénesis y adaptación de las bacterias a nuevos nichos ecológicos (Osborne et al., 2009). Previamente se mostró que HilD controla positivamente la expresión del regulador maestro de los genes del flagelo y de quimiotaxis, FlhDC (Singer et al., 2014), lo cual reclutó la movilidad como un factor de virulencia en *Salmonella*. Por otra parte, se encontró que en *Salmonella enterica* el gen ancestral *srfN* se adaptó para ser regulado por SsrB, mediante cambios que se generaron en la secuencia de la región reguladora de este gen, lo que permite la expresión de *srfN* cuando *Salmonella* se encuentra dentro de sus células huésped, lo cual es importante para el desarrollo de la infección sistémica (Osborne et al., 2009). Así, nuestro estudio provee evidencia adicional del reclutamiento de actividades ancestrales para la virulencia de *Salmonella*, a través del establecimiento de nuevas conexiones de regulación transcripcional.

En *E. coli* K-12, se ha descrito que la expresión del gen *phoH* se induce directamente por el regulador PhoB en respuesta a bajos niveles de Pi (Kim et al., 1993). De manera interesante, encontramos que la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium* también se induce cuando hay baja concentración de Pi, pero independientemente de PhoB. Consistente con esto, los sitios de unión de PhoB

que se han identificado en la región reguladora de *phoH* de *E. coli* K-12 no están conservados en la región reguladora de *phoH* de *S. Typhimurium*. Así, las diferencias en la secuencia de la región reguladora del *phoH* de *S. Typhimurium*, con respecto a la de *E. coli* K-12, generaron una conexión para otro regulador, aún desconocido, el cual controla la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium* en respuesta a la concentración de fosfato (Figura 17). Nuestros resultados indican que los reguladores PhoP y SsrB, los cuales son activos en condiciones de bajo nivel de Pi (Fàbrega and Vila, 2013; Pérez-Morales et al., 2017), no están involucrados en la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium* en respuesta a baja concentración de fosfato. Un análisis de búsqueda de probables sitios de unión de reguladores transcripcionales en la secuencia de la región reguladora de *phoH* de *S. Typhimurium*, mediante el programa bioinformático Softberry, reveló probables sitios de unión para los reguladores CpxR, RpoH y OmpR. Queda por definirse si estos reguladores, o alguno de ellos, realmente están involucrados en la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium*.

En resumen, nuestro estudio muestra que en el gen *phoH* de *S. Typhimurium* se adaptaron nuevas conexiones de control transcripcional que involucran al regulador HilD y al menos a otro regulador aún no identificado. El efecto específico de esto, en la virulencia y fisiología de *Salmonella*, queda por investigarse; aunque nuestros resultados sugieren que la regulación de *phoH* por HilD podría ser importante para la movilidad de *Salmonella*.

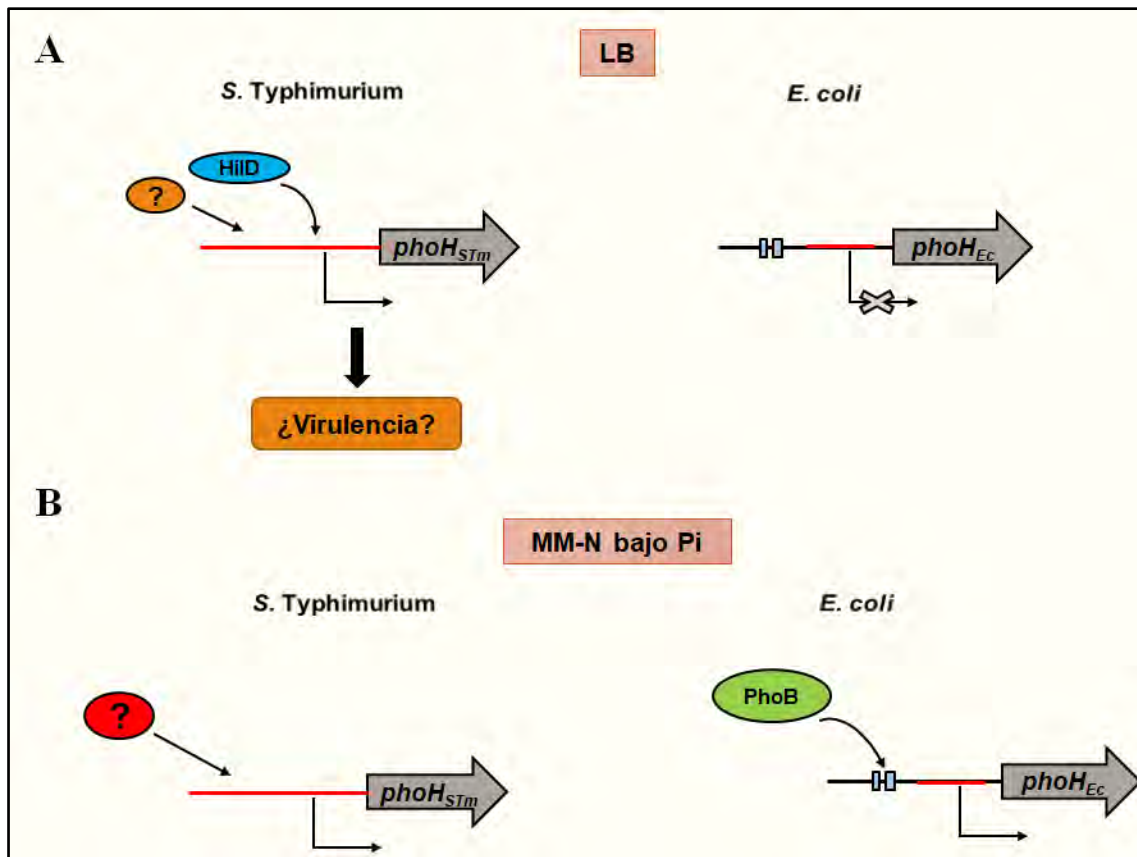


Fig. 17. Modelo ilustrativo de la regulación de la expresión de *phoH* en *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12. A) En medio LB, la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium*, pero no de *phoH* de *E. coli* K-12, se induce por HilD y probablemente otro factor aún desconocido. B) En medio mínimo N (MM-N), la expresión de *phoH* se induce en *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12, en respuesta a una baja concentración de fosfato; en *E. coli* dicha inducción es mediada por el regulador PhoB, mientras que en *S. Typhimurium* es a través de un regulador aún no identificado.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los genes *phoH* y *SL1896* no se requieren para la invasión de *S. Typhimurium* a células HeLa o macrófagos RAW264.7, ni para la replicación/sobrevivencia de *S. Typhimurium* dentro de células HeLa.
2. El gen *SL1896* parece estar implicado en la replicación/sobrevivencia de *S. Typhimurium* dentro de macrófagos RAW264.7.
3. El gen *phoH* parece estar involucrado en la movilidad de *S. Typhimurium*.
4. La secuencia de la región reguladora de *phoH* solo conserva un segmento de 95 pb entre *S. Typhimurium* y *E. coli* K-12, mientras que el gen estructural tiene una identidad de 82 %.
5. La expresión de *phoH* de *S. Typhimurium*, pero no la de *phoH* de *E. coli* K-12, se induce por HilD y otro factor aún no identificado, en respuesta al crecimiento en LB.
6. La expresión de *phoH* de *S. Typhimurium*, al igual que *phoH* de *E. coli* K-12, se induce en respuesta a bajos niveles de Pi. Sin embargo, dicha inducción en *S. Typhimurium* es independiente de PhoB; mientras que en *E. coli* K-12 está mediada por PhoB.
7. PhoP y SsrB no están involucrados en la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium* en respuesta a baja concentración de fosfato.

IX. PERSPECTIVAS

1. Complementar las mutantes $\Delta phoH::km$ y $\Delta SL1896::km$ con plásmidos que expresen el respectivo gen, para ver si se restauran los fenotipos afectados en estas cepas.
2. Analizar la virulencia de las mutantes $\Delta phoH::km$ y $\Delta SL1896::km$ en la infección intestinal y sistémica de ratones C57BL/6.
3. Identificar el regulador, o reguladores, involucrados en la inducción de la expresión de *phoH* de *S. Typhimurium* en respuesta a una baja concentración de fosfato, mediante mutagénesis generalizada con transposones. Investigar si los reguladores $\Delta cpxR$ y $\Delta ompR$ están involucrados en esto.

X. APÉNDICE

10.1. Medios de cultivos empleados

Medio Lysogenic Broth (LB):

Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	10 g

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

Medio mínimo N (MM-N):

KCl	5 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	7.5 mM
K ₂ SO ₄	0.5 mM
Tris HCL pH 7.5	100 mM
MgCl ₂	10 μM
Glicerol	0.5 % v/v
Casaminoácidos	0.1 %
KH ₂ PO ₄	640 μM (condición de alto Pi)

[75]

KH_2PO_4

64 μM (condición de bajo Pi)

Se esteriliza 20 minutos a 121°C con 15 libras de presión.

Medio SOC

Bacto-triptona	2 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl 5M	200 μL
KCl 1M	250 μL
MgCl ₂ 1M	1 mL
MgSO ₄ 1M	1 mL
Glucosa	0.36 g

Se afora a 100 mL con agua desionizada y se esteriliza durante 20 minutos a 121°C con 15 libras de presión.

Medio SOB

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	2.5 g
NaCl	0.25 g
KCl	1.25 g
Glucosa	0.36 g

Se afora a 500 mL con agua desionizada y se esteriliza 20 minutos a 121°C con 15 libras de presión.

10.2. Reactivos empleados para los ensayos de invasión y replicación/sobrevivencia en células HeLa y macrófagos RAW 264.7

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) [GIBCO (12100-046)]

Agua destilada 800 mL

Bicarbonato de sodio 3.7 g

Se ajusta el pH a 7.2 y se esteriliza por filtración.

Se suplementa el medio con los siguientes reactivos:

Sodium pyruvate solution 100 mM (4°C) [SIGMA (S8636)] 10 mL/L

L-glutamine 200 mM (-20°C) [GIBCO (25030-081)] 10 mL/L

Fetal bovine serum-Inactivated (-20°C) [Byproductos (Lot. 13001)] 10 %

PBS 1X

Se diluyó 1:10 el PBS 10X

Solución de lisis

Desoxicolato de sodio 100 mg

PBS 1X csp 50 mL

10.3. Reactivos empleados para “Western blot”

Buffer de transferencia

Tris	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0.04 % v/v
Metanol	20 % v/v

PBS 10X

Na ₂ HPO ₄	6.1 g
KH ₂ PO ₄	2 g
KCl	2 g
NaCl	80 g

Se afora a 1 L con agua desionizada y se ajusta a pH 6.8. Posteriormente se esteriliza 20 minutos a 121°C con 15 libras de presión.

PBS-T

PBS	100 mL
Tween-20	3 mL

Solución bloqueadora

Leche en polvo sin grasa	1.5 g
PBS-T	csp 30 mL

XI. CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmer, B.M.M., Gunn, J.S., 2011. Interaction of *Salmonella* spp. With the intestinal microbiota. *Front. Microbiol.* 2, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00101>
- Altier, C., 2005. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* 43 Spec No, 85–92. <https://doi.org/2135> [pii]
- Altier, C., Suyemoto, M., Lawhon, S.D., 2000. Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion genes by csrA. *Infect. Immun.* 68, 6790–7.
- Anjum, M.F., Marooney, C., Fookes, M., Baker, S., Dougan, G., Ivens, A., Woodward, M.J., 2005. Identification of Core and Variable Components of the *Salmonella enterica* Subspecies I Genome by Microarray. *Infect. Immun.* 73, 7894–7905. [https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.7894–7905.2005](https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.7894-7905.2005)
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H., 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Banda, M.M., López, C., Manzo, R., Rico-Pérez, G., García, P., Rosales-Reyes, R., De la Cruz, M.A., Soncini, F.C., Portillo, F.G., Bustamante, V.H., 2018. HilD and PhoP independently regulate the expression of *grhD1*, a novel gene required for *Salmonella* Typhimurium invasion of host cells. *Sci. Rep.* 8, 4841. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23068-0>
- Bakowski, M.A., Braun, V., Lam, G.Y., Yeung, T., Heo, W. Do, Meyer, T., Finlay, B.B., Grinstein, S., Brumell, J.H., 2010. The Phosphoinositide Phosphatase SopB Manipulates Membrane Surface Charge and Trafficking of the *Salmonella*-Containing Vacuole. *Cell Host Microbe* 7, 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.011>
- Bäumler, A.J., Tsolis, R.M., Heffron, F., 1996. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella* Typhimurium to murine Peyer's patches. *Microbiology* 93, 279–283.
- 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, 1295–305. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.3.1295>

- Behlau, I., Miller, S.I., 1993. A PhoP-repressed gene promotes *Salmonella* Typhimurium invasion of epithelial cells. *J. Bacteriol.* 175, 4475–84.
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., Swaminathan, B., 2000. *Salmonella* Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2465–2467.
- Brosius, J., 1984. Toxicity of an overproduced foreign gene product in *Escherichia coli* and its use in plasmid vectors for the selection of transcription terminators. *Gene.* [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(84\)90137-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(84)90137-9)
- Bueno, S.M., Wozniak, A., Leiva, E.D., Riquelme, S.A., Carreño, L.J., Hardt, W.-D., Riedel, C.A., Kalergis, A.M., 2010. *Salmonella* pathogenicity island 1 differentially modulates bacterial entry to dendritic and non-phagocytic cells. *Immunology* 130, 273–87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03233.x>
- Bustamante, V.H., Martinez, 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.* 105, 14591–14596. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801205105>
- Callaway, T.R., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Byrd, J.A., Nisbet, D.J., 2008. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. *J. Anim. Sci.* 86, 163–172. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0457>
- Clark, L., Perrett, C.A., Malt, L., Harward, C., Humphrey, S., Jepson, K.A., Martinez-Argudo, I., Carney, L.J., La Ragione, R.M., Humphrey, T.J., Jepson, M.A., 2011. Differences in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain invasiveness are associated with heterogeneity in SPI-1 gene expression. *Microbiology* 157, 2072–83. <https://doi.org/10.1099/mic.0.048496-0>
- Clark, M.A., Jepson, M.A., Simmons, N.L., Hirst, B.H., 1994. Preferential interaction of *Salmonella* Typhimurium with mouse Peyer's patch M cells. *Res. Microbiol.* 145, 543–52.
- Coburn, B., Grassl, G.A., Finlay, B.B., 2007. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol. Cell Biol.* 85, 112–118. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100007>
- Colgan, A.M., Kröger, C., Diard, M., Hardt, W.D., Puente, J.L., Sivasankaran,

- S.K., Hokamp, K., Hinton, J.C.D., 2016. The Impact of 18 Ancestral and Horizontally-Acquired Regulatory Proteins upon the Transcriptome and sRNA Landscape of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. PLoS Genet. 12, 1–42. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006258>
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 6640–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
- Desin, T.S., Mickael, C.S., Lam, P.-K.S., Potter, A.A., Köster, W., 2010. Protection of epithelial cells from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis invasion by antibodies against the SPI-1 type III secretion system. Can. J. Microbiol. 56, 522–526. <https://doi.org/10.1139/w10-034>
- Dillon, S.C., Dorman, C.J., 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. Nat. Rev. Microbiol. 8, 185–195. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2261>
- Ellermeier, C.D., Ellermeier, J.R., Slauch, J.M., 2005. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Mol. Microbiol. 57, 691–705. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04737.x>
- Fàbrega, A., Vila, J., 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. Clin. Microbiol. Rev. 26, 308–341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>
- Fahlen, T.F., Wilson, R.L., Boddicker, J.D., Jones, B.D., 2001. Hha is a negative modulator of transcription of *hilA*, the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion gene transcriptional activator. J. Bacteriol. 183, 6620–9. <https://doi.org/10.1128/JB.183.22.6620-6629.2001>
- Fink, S.L., Cookson, B.T., 2007. Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. Cell. Microbiol. 9, 2562–2570. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01036.x>
- Finlay, B.B., Ruschkowski, S., Dedhar, S., 1991. Cytoskeletal rearrangements accompanying salmonella entry into epithelial cells. J. Cell Sci. 99, 283–296.
- Foley, S.L., Lynne, A.M., Nayak, R., 2008. *Salmonella* challenges: Prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates 1,2. J. Anim. Sci 86, 149–162. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0464>

- 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, 331–9. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.331-339.2006>
- Foster, J.W., 1995. Low pH Adaptation and the Acid Tolerance Response of *Salmonella* Typhimurium. *Crit. Rev. Microbiol.* 21, 215–237. <https://doi.org/10.3109/10408419509113541>
- Foster, J.W., Hall, H.K., 1991. Inducible pH Homeostasis and the Acid Tolerance Response of *Salmonella* Typhimurium. *J. Bacteriol.* 173, 5129–5135.
- Gal-Mor, O., Finlay, B.B., 2006. Pathogenicity islands: A molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell. Microbiol.* 8, 1707–1719. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00794.x>
- Gao, R., Stock, A.M., 2009. Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 133–154. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073214>
- García Vescovi, E., Soncini, F.C., Groisman, E.A., 1996. Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* 84, 165–74.
- Gourse, R.L., Ross, W., Rutherford, S.T., 2006. General pathway for turning on promoters transcribed by RNA polymerases containing alternative σ factors. *J. Bacteriol.* 188, 4589–4591. <https://doi.org/10.1128/JB.00499-06>
- Grenz, J.R., Cott Chubiz, J.E., Thaprawat, P., Slauch, J.M., 2018. HilE Regulates HilD by Blocking DNA Binding in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 200 (8). JB.00750-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00750-17>
- Grimont, P., Weill, F.-X., 2008. Antigenic formulae of the *Salmonella* servovars. *WHO Collab. Cent. Ref. Res. Salmonella* 1–167.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., Tschäpe, H., 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* 23, 1089–1097. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3101672.x>
- Haraga, A., Ohlson, M.B., Miller, S.I., 2008. *Salmonella* interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 53–66. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1788>
- Hensel, M., 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int. J. Med. Microbiol.* 294, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.025>
- Hinton, J.C., Santos, D.S., Seirafi, A., Hulton, C.S., Pavitt, G.D., Higgins, C.F.,

1992. Expression and mutational analysis of the nucleoid-associated protein H-NS of *Salmonella* Typhimurium. *Mol. Microbiol.* 6, 2327–37.
- Hoiseth, S.K., Stocker, B.A., 1981. Aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291, 238–9.
- Horton, R.A., Wu, G., Speed, K., Kidd, S., Davies, R., Coldham, N.G., Duff, J.P., 2013. Wild birds carry similar *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to those found in domestic animals and livestock. *Res. Vet. Sci.* 95, 45–48. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.02.008>
- Huang, Y.-H., Ferrières, L., Clarke, D.J., 2006. The role of the Rcs phosphorelay in Enterobacteriaceae. *Res. Microbiol.* 157, 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.11.005>
- Humphreys, D., Hume, P.J., Koronakis, V., 2009. The *Salmonella* Effector SptP Dephosphorylates Host AAA+ ATPase VCP to Promote Development of its Intracellular Replicative Niche. *Cell Host Microbe* 5, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.010>
- Ibarra, J.A., Knodler, L.A., Sturdevant, D.E., Virtaneva, K., Carmody, A.B., Fischer, E.R., Porcella, S.F., Steele-Mortimer, O., 2010. Induction of *Salmonella* pathogenicity island 1 under different growth conditions can affect *Salmonella*-host cell interactions in vitro. *Microbiology* 156, 1120–33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032896-0>
- Igo, M.M., Ninfa, A.J., Silhavy, T.J., 1989. A bacterial environmental sensor that functions as a protein kinase and stimulates transcriptional activation. *Genes Dev.* 3, 598–605.
- 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. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00428>
- Johansson, C., Ingman, M., Wick, M.J., Jo Wick, M., 2006. Elevated neutrophil, macrophage and dendritic cell numbers characterize immune cell populations in mice chronically infected with *Salmonella*. *Microb. Pathog.* 41, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2006.03.004>
- Jones, B.D., 2005. *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *J. Microbiol.* 43 Spec No, 110–7. <https://doi.org/2132> [pii]
- Jones, G.W., Rabert, D.K., Svinarich, D.M., Whitfield2, A.H.J., 1982. Association of Adhesive, Invasive, and Virulent Phenotypes of *Salmonella* Typhimurium

- with Autonomous 60-Megadalton Plasmids. *Infect. Immun.* 38, 476–486.
- Kim, S.K., Makino, K., Amemura, M., Shinagawa, H., Nakata, A., 1993. Molecular analysis of the *phoH* gene, belonging to the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175, 1316–1324. <https://doi.org/10.1128/jb.175.5.1316-1324.1993>
- Knodler, L.A., Finlay, B.B., Steele-Mortimer, O., 2005. The *Salmonella* effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. *J. Biol. Chem.* 280, 9058–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412588200>
- Koonin, E. V, Rudd, K.E., 1996. Two domains of superfamily I helicases may exist as separate proteins. *Protein Sci.* 5, 178–180.
- Lan, R., Reeves, P.R., Octavia, S., 2009. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect. Genet. Evol.* 9, 996–1005. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.04.011>
- Lara-Tejero, M., Galán, J.E., 2009. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 1-encoded type III secretion system translocases mediate intimate attachment to nonphagocytic cells. *Infect. Immun.* 77, 2635–42. <https://doi.org/10.1128/IAI.00077-09>
- Lopez, C.A., Winter, S.E., Rivera-Chávez, F., Xavier, M.N., Poon, V., Nuccio, S.P., Tsolis, R.M., Bäumler, A.J., 2012. Phage-mediated acquisition of a type III secreted effector protein boosts growth of *Salmonella* by nitrate respiration. *MBio* 3, 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00143-12>
- Lostroh, C.P., Lee, C.A., 2001. The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect.* 3, 1281–1291. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01488-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01488-5)
- Lu, R., Wu, S., Liu, X., Xia, Y., Zhang, Y.-G., Sun, J., 2010. Chronic effects of a *Salmonella* type III secretion effector protein AvrA *in vivo*. *PLoS One* 5, e10505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010505>
- Lubin, E.A., Henry, J.T., Fiebig, A., Crosson, S., Laub, M.T., 2016. Identification of the PhoB regulon and role of PhoU in the phosphate starvation response of *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 198, 187–200. <https://doi.org/10.1128/JB.00658-15>
- Lucas, R.L., Lostroh, C.P., Dirusso, C.C., Spector, M.P., Wanner, B.L., Lee, C.A., 2000. Multiple Factors Independently Regulate *hilA* and Invasion Gene Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 182,

1872–1882.

- Lundberg, U., Vinatzer, U., Berdnik, D., von Gabain, A., Baccharini, M., 1999. Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J. Bacteriol.* 181, 3433–7.
- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A., Hoekstra, R.M., 2010. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis.* 50, 882–889. <https://doi.org/10.1086/650733>
- Mallo, G. V, Espina, M., Smith, A.C., Terebiznik, M.R., Alemán, A., Finlay, B.B., Rameh, L.E., Grinstein, S., Brumell, J.H., 2008. SopB promotes phosphatidylinositol 3-phosphate formation on *Salmonella* vacuoles by recruiting Rab5 and Vps34. *J. Cell Biol.* 182, 741–52. <https://doi.org/10.1083/jcb.200804131>
- Martínez-Flores, I., Pérez-Morales, D., Sánchez-Pérez, M., Paredes, C.C., Collado-Vides, J., Salgado, H., Bustamante, V.H., 2016. In silico clustering of *Salmonella* global gene expression data reveals novel genes co-regulated with the SPI-1 virulence genes through HilD. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep37858>
- Martínez, L.C., Banda, M.M., Fernández-Mora, M., Santana, F.J., Bustamante, V.H., 2014. HilD induces expression of *Salmonella* pathogenicity Island 2 genes by displacing the global negative regulator H-NS from *ssrAB*. *J. Bacteriol.* 196, 3746–3755. <https://doi.org/10.1128/JB.01799-14>
- Martínez, L.C., Yakhnin, H., Camacho, M.I., Georgellis, D., Babitzke, P., Puente, J.L., Bustamante, V.H., 2011. Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Mol. Microbiol.* 80, 1637–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07674.x>
- Marzan, L.W., Shimizu, K., 2011. Metabolic regulation of *Escherichia coli* and its *phoB* and *phoR* genes knockout mutants under phosphate and nitrogen limitations as well as at acidic condition. *Microb. Cell Fact.* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-39>
- Mayer, C.A., Neilson, A.A., 2010. Typhoid and paratyphoid fever: Prevention in

- travellers. Aust. Fam. Physician 39, 847–851.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70239-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70239-5)
- Mills, D.M., Bajaj, V., Lee, C.A., 1995. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella* Typhimurium invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. Mol. Microbiol. 15, 749–759. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02382.x>
- Misselwitz, B., Kreibich, S.K., Rout, S., Stecher, B., Periaswamy, B., Hardt, W.-D.D., 2011. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium binds to hela cells via fim-mediated reversible adhesion and irreversible type three secretion system 1-mediated docking. Infect. Immun. 79, 330–341.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00581-10>
- Müller, A.J., Hoffmann, C., Galle, M., Van Den Broeke, A., Heikenwalder, M., Falter, L., Misselwitz, B., Kremer, M., Beyaert, R., Hardt, W.-D., 2009. The S. Typhimurium Effector SopE Induces Caspase-1 Activation in Stromal Cells to Initiate Gut Inflammation. Cell Host Microbe 6, 125–136.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.07.007>
- Ohl, M.E., Miller, S.I., 2001. *Salmonella*: A Model for Bacterial Pathogenesis. Annu. Rev. Med. 52, 259–274.
<https://doi.org/10.1146/annurev.med.52.1.259>
- Olekhovich, I.N., Kadner, R.J., 2007. Role of nucleoid-associated proteins Hha and H-NS in expression of *Salmonella enterica* activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion. J. Bacteriol. 189, 6882–6890.
<https://doi.org/10.1128/JB.00905-07>
- Olekhovich, I.N., Kadner, R.J., 2006. Crucial Roles of Both Flanking Sequences in Silencing of the *hilA* promoter in *Salmonella enterica*. J. Mol. Biol. 357, 373–386. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2006.01.007>
- Osborne, S.E., Walthers, D., Tomljenovic, A.M., Mulder, D.T., Silphaduang, U., Duong, N., Lowden, M.J., Wickham, M.E., Waller, R.F., Kenney, L.J., Coombes, B.K., 2009. Pathogenic adaptation of intracellular bacteria by rewiring a cis-regulatory input function. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 3982–3987. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811669106>
- Paredes-Amaya, C.C., Valdés-García, G., Juárez-González, V.R., Rudiño-Piñera, E., Bustamante, V.H., 2018. The Hcp-like protein HilE inhibits homodimerization and DNA binding of the virulence-associated

- transcriptional regulator HilD in *Salmonella*. J. Biol. Chem. jbc.RA117.001421. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001421>
- Parry, C.M., Hien, T.T., Dougan, G., White, N.J., Farrar, J.J., 2002. Typhoid Fever. N. Engl. J. Med. 347, 1770–1782. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020201>
- Pavlova, B., Volf, J., Ondrackova, P., Matiasovic, J., Stepanova, H., Crhanova, M., Karasova, D., Faldyna, M., Rychlik, I., 2011. SPI-1-encoded type III secretion system of *Salmonella enterica* is required for the suppression of porcine alveolar macrophage cytokine expression. Vet. Res. 42, 16. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-16>
- Pegues, D.A., Hantman, M.J., Behlau, I., Miller, S.I., 1995. PhoP/PhoQ transcriptional repression of *Salmonella* Typhimurium invasion genes: evidence for a role in protein secretion. Mol. Microbiol. 17, 169–81.
- Pérez-Morales, D., Banda, M.M., Chau, N.Y.E., Salgado, H., Martínez-Flores, I., Ibarra, J.A., Ilyas, B., Coombes, B.K., Bustamante, V.H., 2017. The transcriptional regulator SsrB is involved in a molecular switch controlling virulence lifestyles of *Salmonella*. PLoS Pathog. 13, 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006497>
- Petrone, B.L., Stringer, A.M., Wade, J.T., 2014. Identification of HilD-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Bacteriol. 196, 1094–1101. <https://doi.org/10.1128/JB.01449-13>
- Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W., Schoolnik, G.K., 1996. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. Mol. Microbiol. 20, 87–100.
- Que, F., Wu, S., Huang, R., 2013. *Salmonella* Pathogenicity Island 1(SPI-1) at Work. Curr Microbiol 66, 582–587. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0307-8>
- Radtke, A.L., Wilson, J.W., Sarker, S., Nickerson, C.A., 2010. Analysis of interactions of *Salmonella* type three secretion mutants with 3-D intestinal epithelial cells. PLoS One 5, e15750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015750>
- Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R.P., Akçelik, M., Bäumler, A.J., Ba, A.J., 2006. Capsule-Mediated Immune Evasion: a New Hypothesis Explaining Aspects of Typhoid Fever Pathogenesis MINIREVIEWS Capsule-Mediated

- Immune Evasion : a New Hypothesis Explaining Aspects of Typhoid Fever Pathogenesis 74, 19–27. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.19>
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., Ricciardi-Castagnoli, P., 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2, 361–367. <https://doi.org/10.1038/86373>
- Romeo, T., Gong, M., Liu, M.Y., Brun-Zinkernagel, A.M., 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, 4744–55.
- Rosales-Reyes, R., Pérez-López, A., Sánchez-Gómez, C., Hernández-Mote, R.R., Castro-Eguiluz, D., Ortiz-Navarrete, V., Alpuche-Aranda, C.M., 2012. *Salmonella* infects B cells by macropinocytosis and formation of spacious phagosomes but does not induce pyroptosis in favor of its survival. *Microb. Pathog.* 52, 367–74. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2012.03.007>
- Saini, S., Ellermeier, J.R., Slauch, J.M., Rao, C. V., 2010. The role of coupled positive feedback in the expression of the SPI1 type three secretion system in *Salmonella*. *PLoS Pathog.* 6, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001025>
- Saini, S., Rao, C. V., 2010. SprB Is the molecular link between *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4. *J. Bacteriol.* 192, 2459–2462. <https://doi.org/10.1128/JB.00047-10>
- Sana, T.G., Flaugnatti, N., Lugo, K.A., Lam, L.H., Jacobson, A., Baylot, V., Durand, E., Journet, L., Cascales, E., Monack, D.M., 2016. *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E5044–E5051. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608858113>
- Santos, R.L., Raffatellu, M., Bevins, C.L., Adams, L.G., Tükel, Ç., Tsolis, R.M., Bäumler, A.J., 2009. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends Microbiol.* 17, 498-506. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.008>
- Schechter, L.M., Lee, C.A., 2001. AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella* Typhimurium *hilA* promoter. *Mol. Microbiol.* 40, 1289–1299. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02462.x>
- Singer, H.M., Kühne, C., Deditius, J.A., Hughes, K.T., Erhardt, M., 2014. The

- Salmonella Spi1 virulence regulatory protein HilD directly activates transcription of the flagellar master operon *flhDC*. *J. Bacteriol.* 196, 1448–1457. <https://doi.org/10.1128/JB.01438-13>
- Steele-Mortimer, O., Méresse, S., Gorvel, J.P., Toh, B.H., Finlay, B.B., 1999. Biogenesis of *Salmonella* typhimurium-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell. Microbiol.* 1, 33–49. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.1999.00003.x>
- Takaya, A., Suzuki, A., Kikuchi, Y., Eguchi, M., Isogai, E., Tomoyasu, T., Yamamoto, T., 2005. Derepression of *Salmonella* pathogenicity island 1 genes within macrophages leads to rapid apoptosis via caspase-1- and caspase-3-dependent pathways. *Cell. Microbiol.* 7, 79–90. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00435.x>
- Teplitski, M., Al-Agely, A., Ahmer, B.M.M., 2006. Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* 152, 3411–24. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29118-0>
- Teplitski, M., Goodier, R.I., Ahmer, B.M.M., 2003. Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J. Bacteriol.* 185, 7257–65.
- Thijs, I.M. V, De Keersmaecker, S.C.J., Fadda, A., Engelen, K., Zhao, H., McClelland, M., Marchal, K., Vanderleyden, J., 2007. Delineation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulon through genome-wide location and transcript analysis. *J. Bacteriol.* 189, 4587–4596. <https://doi.org/10.1128/JB.00178-07>
- Tiwari, R.P., Sachdeva, N., Hoondal, G.S., Grewal, J.S., 2004. Adaptive acid tolerance response in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J. Basic Microbiol.* 44, 137–146. <https://doi.org/10.1002/jobm.200310333>
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., Bossi, L., 2001. Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 15264–15269. <https://doi.org/10.1073/pnas.261348198>
- 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., Tsolis, R.M., Roth, J.R., Bäumlér, A.J., 2010. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella* HHS Public Access. *Nature*. Sept. 23, 426–429.

<https://doi.org/10.1038/nature09415>

Wray, C. (Clifford), Wray, A., 2000. *Salmonella* in domestic animals. CABI Pub.

Zhou, L., Lei, X.H., Bochner, B.R., Wanner, B.L., 2003. Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J Bacteriol* 185, 4956–4972.

<https://doi.org/10.1128/JB.185.16.4956>