



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA HILD: UN REGULADOR CENTRAL DE LA  
VIRULENCIA DE *Salmonella enterica***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**CLAUDIA CRISTINA PAREDES AMAYA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN**  
FACULTAD DE CIENCIAS, IBT, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DRA. BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.

**DR. HORACIO REYES VIVAS**  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, UNAM.

**CD. MX. MARZO, 2019.**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA HILD: UN REGULADOR CENTRAL DE LA  
VIRULENCIA DE *Salmonella enterica***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**CLAUDIA CRISTINA PAREDES AMAYA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN**  
FACULTAD DE CIENCIAS, IBT, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DRA. BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM.

**DR. HORACIO REYES VIVAS**  
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, UNAM.

**MÉXICO, CD. MX. MARZO, 2019.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/171/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente.

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **29 de octubre de 2018**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **PAREDES AMAYA CLAUDIA CRISTINA** con número de cuenta **513451733** con la tesis titulada: "**Caracterización de la proteína HilD: un regulador central de la virulencia de *Salmonella enterica***", realizada bajo la dirección del **DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN**:

Presidente:	<b>DR. JUAN MIRANDA RIOS</b>
Vocal:	<b>DRA. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ</b>
Secretario:	<b>DRA. BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO</b>
Suplente:	<b>DRA. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO</b>
Suplente:	<b>DRA. CINTHIA ERNESTINA NUÑEZ LÓPEZ</b>

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 15 de febrero de 2019



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
Coordinador del Programa



AGNS/MMVA/ASR/grf\*

## **Agradecimientos**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por el apoyo recibido durante el desarrollo de mis estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 290934 que me permitió realizar los estudios de Doctorado. Este proyecto fue apoyado por donativos de CONACYT (254531) y del Programa de Apoyos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA / UNAM (IN203415 and IN202418), otorgados al Dr. Víctor Bustamante.

Al PAEP, por el apoyo económico otorgado para la asistencia a congresos nacionales e internacionales.

Agradezco al Dr. Víctor Bustamante por aceptarme en su grupo de investigación, por toda la orientación, apoyo y enseñanzas brindadas durante estos años. A los miembros del comité tutor, Dra. Bertha González Pedrajo y Dr. Horacio Reyes vivas, por sus aportes y recomendaciones para el desarrollo de este proyecto.

## **Agradecimientos**

Agradezco a todos los miembros del laboratorio 2 del Instituto de Biotecnología de la UNAM por el apoyo brindado durante el desarrollo del Doctorado. Gracias a mi amigo y Biólogo Francisco Javier Santana Estrada y a la Dra. Alejandra Vasquez Ramos por su apoyo y ayuda todos estos años. Asimismo, a todos los miembros del grupo del Dr. Víctor Bustamante, por participar en mi proceso de formación doctoral y por brindarme su amistad.

Agradezco a Dios y a la vida, por haberme dado la oportunidad de cumplir un sueño más. A mi familia y principalmente a mi mamá, por todo el apoyo durante estos años lejos de casa, el cual fue fundamental para alcanzar este logro.

*“En la vida todo es posible y no cabe duda que  
con mucho esfuerzo, dedicación, amor y trabajo,  
todos los sueños se hacen realidad.  
Gracias Dios”*



## Tabla de contenido

Resumen .....	14
Abstract.....	16
1. Introducción .....	18
1.1. El género <i>Salmonella</i> .....	18
1.2. Mecanismos de patogenicidad .....	18
1.3. Factores de virulencia de <i>S. enterica</i> .....	19
1.3.1. Flagelo .....	19
1.3.2. Plásmidos.....	20
1.3.3. Adhesinas y fimbrias .....	20
1.3.4. Islas de patogenicidad.....	20
1.4. Regulación de la expresión de los genes de SPI-1.....	23
1.4.1. Reguladores clave de la expresión de los genes de SPI-1 .....	24
2. Antecedentes .....	31
2.1. Interacción de HilD con HilE .....	31
2.2. Efecto de compuestos producidos por la microbiota sobre la expresión de los genes de SPI-1 .....	32
3. Objetivos .....	35
3.1. Objetivo general.....	35
3.2. Objetivos específicos .....	35
4. Métodos.....	36
4.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo .....	36
4.2. Construcción de plásmidos .....	37
4.3. Ensayos de dimerización de HilD.....	43
4.4. Ensayo de interacción de HilD con HilE .....	45
4.5. Ensayo dimerización de HilE .....	45
4.6. Determinación de la actividad específica de $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) y de Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT) .....	45
4.6.1. Determinación de la concentración de proteínas totales .....	45
4.6.2. Determinación de la actividad específica de $\beta$ -gal .....	46

4.6.3.	Determinación de la actividad específica de CAT .....	46
4.7.	Detección de proteínas por Western-blot.....	47
4.8.	Expresión y purificación de MBP-HilD .....	48
4.9.	Expresión y purificación de Trx-His y Trx-His-HilE.....	49
4.10.	Ensayos de retardo en gel (EMSA, del inglés “Electrophoretic Mobility Shift Assay”) con DNA .....	50
4.11.	Ensayo de estabilidad de HilD .....	51
4.12.	Análisis de proteínas secretadas .....	52
4.13.	Cromatografía de exclusión molecular .....	52
4.14.	Ensayos de “pull-down” .....	53
4.15.	Alineamiento de secuencia y predicción de estructura terciaria de HilE y HilD y predicción de la estructura cuaternaria de HilE .....	53
4.16.	Construcción del modelo del dímero de HilD y de interacción de HilD con HilE y mutagénesis <i>in silico</i> por alanina .....	54
4.17.	Construcción de la cepa mutante $\Delta hilD_{130-309}:kan$ .....	54
4.18.	Análisis estadísticos .....	55
5.	Resultados .....	56
5.1.	HilE interacciona con la región central de HilD .....	56
5.2.	HilE no afecta la estabilidad de HilD .....	62
5.3.	HilD actúa como dímero y su dominio de dimerización se encuentra en la región central 64	
5.4.	La dimerización de HilD es importante para la función .....	68
5.5.	HilE interfiere con la dimerización de HilD .....	71
5.6.	HilE afecta la actividad de HilD por un mecanismo independiente de la dimerización.	73
5.7.	HilE inhibe la unión de HilD al DNA.....	74
5.8.	HilE comparte similitud de secuencia y está estructuralmente relacionada con las proteínas Hcp del sistema de secreción tipo 6 (SST6).....	76
5.9.	HilE forma dímeros y el modelo de la estructura cuaternaria indica que podría formar hexámeros .....	78
5.10.	Modelo de la estructura terciaria de HilD .....	80
5.11.	Predicción de aminoácidos de HilD involucrados en la dimerización.....	81

5.12.	Los aminoácidos L177, L178, Y180, F181 y F184 no están involucrados en la dimerización de HilD.....	83
5.13.	Predicción de aminoácidos de HilD involucrados en la interacción con HilE.....	85
5.14.	Los aminoácidos Y180, F181 y F184 están involucrados en la interacción de HilD con HilE	87
5.15.	Las mutaciones Y180A, F181A y F184A no afectan la actividad de la proteína HilD	89
5.16.	HilE no inhibe la dimerización de la mutante de HilD en los aminoácidos Y180, F181, F184, pero sí afecta su actividad.....	90
5.17.	La región N-terminal de HilD participa en la detección de señales como los ácidos grasos y sales biliares.....	92
6.	Discusión.....	98
7.	Conclusiones .....	104
9.	Perspectivas.....	106
10.	Referencias .....	107
11.	Anexo: artículo .....	114

## Lista de figuras

Figura 1. SPI-1 de <i>Salmonella enterica</i> .....	21
Figura 2. Predicción de dominios por medio de SMART (simple modular architecture research tool).....	26
Figura 3. Cascada de regulación de los genes de SPI-1. ....	29
Figura 4. El gen <i>hilE</i> está localizado en una isla genómica de <i>S. Typhimurium</i> y <i>S. bongori</i> que está ausente en <i>E. coli</i> K-12.....	30
Figura 5. HilE interacciona con la región central de HilD.....	58
Figura 6. Purificación de proteínas MBP-HilD, Trx-His-HilE y Trx-His.....	59
Figura 7. Perfil de proteínas secretadas de la cepa mutante $\Delta hilD$ y WT de <i>S. Typhimurium</i> conteniendo los plásmidos que expresan las proteínas MBP-HilD y Trx-His-HilE, respectivamente.....	60
Figura 8. Ensayo de “pull-down” que muestra la interacción de HilD con HilE.....	62
Figura 9. HilE no afecta la estabilidad de HilD.....	63
Figura 10. HilD forma homodímeros. ....	65
Figura 11. Cromatografía de exclusión molecular de MBP-HilD.....	66
Figura 12. HilD forma homodímeros a través de su región central.. ....	67
Figura 13. LexA <sub>DBD</sub> -HilD <sub>221-309</sub> no induce la expresión de <i>hilA</i> .....	69
Figura 14. LexA <sub>DBDwt</sub> -LZ-HilD <sub>221-309</sub> dimeriza.....	70
Figura 15. HilE afecta la dimerización de HilD.....	73
Figura 16. HilE afecta la actividad de HilD por un mecanismo independiente de la dimerización.. ..	74
Figura 17. HilE inhibe la unión de HilD al DNA.....	75
Figura 18. Comparación de la secuencia y estructura de HilE con las proteínas Hcp.. ....	77
Figura 19. HilE forma dímeros.....	79
Figura 20. Modelo del hexámero de HilE.....	80
Figura 21. Modelo de la estructura terciaria de HilD.....	81
Figura 22. Modelo del dímero de HilD. ....	82
Figura 23. Alineamiento de las secuencias de HilD y AraC. ....	83
Figura 24. Las proteínas mutantes HilD <sub>Y180-F181-F184</sub> y HilD <sub>L177-I178</sub> forman dímeros.. ....	84
Figura 25. Modelos de interacción de HilD con HilE.....	86
Figura 26. Los aminoácidos de HilD Y180, F181 Y F184 son requeridos para su interacción con HilE.....	88
Figura 28. HilE no inhibe la dimerización de HilD <sub>Y180A-F181A-F184A</sub> pero si afecta su actividad....	91
Figura 29. Representación esquemática de la construcción de la mutante $\Delta hilD_{130:309}::kan$ . ....	93
Figura 30. PCR para verificar la mutación $\Delta hilD_{130:309}::kan$ en el cromosoma de <i>S. Typhimurium</i> . ..	94
Figura 31. La cepa de <i>S. Typhimurium</i> $\Delta hilD_{130:309}::kan$ induce la expresión de <i>hilA</i> . ....	95

Figura 32. La actividad de la proteína HilD <sub>130-309</sub> no es inhibida por el propionato, butirato, oleato ni deoxicolato de sodio. ....	96
Figura 33. Modelo del mecanismo de regulación de HilD por HilE. ....	105

## Lista de tablas

Tabla 1. Cepas bacterianas usadas en este estudio .....	36
Tabla 2. Plásmidos usados en este estudio .....	39
Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este estudio .....	41
Tabla 4. Aminoácidos probablemente involucrados en la dimerización de HilD .....	82
Tabla 5. Aminoácidos de HilD probablemente involucrados en la interacción con HilE.....	86

## Lista de abreviaturas

SPI: isla de patogenicidad de *Salmonella*

SPI-1: isla de patogenicidad 1 de *Salmonella enterica*

SPI-2: isla de patogenicidad 2 de *Salmonella enterica*

SST3: sistema de secreción tipo 3

Hcp: proteína corregulada por hemolisina

SST6: sistema de secreción tipo 6

SCV: vacuolas contenedoras de *Salmonella*

HTH: hélice vuelta hélice

DBD: dominio de unión a DNA

MBP: proteína de unión a maltosa

Trx: tiorredoxina

LZ: leucina “zypper”

CAT: cloranfenicol acetil transferasa

EMSA: ensayo de cambio en la movilidad electroforética

LB: caldo lisogénico

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido

PDB: banco de datos de proteínas

LexA<sub>DBDwt</sub>: dominio de unión a DNA de LexA silvestre

LexA<sub>DBDmut</sub>: dominio de unión a DNA de LexA mutado

## Resumen

HilD es un regulador transcripcional perteneciente a la familia AraC/Xyls, el cual tiene un papel central en la virulencia de *Salmonella*. HilD controla la expresión de genes localizados dentro de SPI-1, requeridos para el ensamble de un sistema de secreción tipo 3 (SST3), así como la expresión de otros genes localizados fuera de esta isla de patogenicidad, los cuales son principalmente requeridos para la invasión de *Salmonella* a las células hospederas. La expresión, concentración y actividad de HilD está altamente controlada. La proteína HilE reprime la expresión de los genes de SPI-1 a través de su interacción con HilD. En este estudio, mediante el uso de métodos genéticos y bioquímicos demostramos el mecanismo por el cual HilE regula la actividad transcripcional de HilD. Encontramos que HilD requiere dimerizar para inducir la expresión de sus genes blanco. Además, nuestros resultados indican que HilE interacciona de manera independiente con la región central y C-terminal de HilD, las cuales son requeridas para la dimerización y la unión al DNA, respectivamente. Consistentemente, observamos que estas interacciones inhiben la dimerización y la unión de HilD al DNA. Asimismo, demostramos que los aminoácidos Y180, F181 y F184, localizados en la región central de HilD, están directamente involucrados en la interacción con HilE. De manera interesante, análisis computacionales revelaron que HilE está estructuralmente relacionada con las proteínas Hcp, las cuales son componentes estructurales del sistema de secreción tipo 6 (SST6) de bacterias Gram negativas. Adicionalmente, encontramos que la región N-terminal de HilD participa en la detección de moléculas que inhiben la actividad de HilD, como ácidos grasos de cadena corta, propionato y butirato, de cadena larga como el oleato y sales biliares como deoxicolato de sodio, presentes en el intestino de humanos y animales. En conclusión, nuestros resultados revelan el mecanismo molecular a través del cual HilE, una proteína similar a Hcp, controla la dimerización y unión al



DNA del regulador de virulencia HilD. Estos hallazgos podrían indicar que la actividad de HilE es el resultado de una adaptación funcional durante la evolución de los mecanismos de patogenicidad de *Salmonella*. Asimismo, nuestros resultados revelan la función de la región N-terminal del regulador HilD, involucrado en la dimerización y en la detección de señales que le permiten a la bacteria expresar los genes requeridos para la invasión del epitelio, en una región específica del intestino de sus hospederos.

## Abstract

HilD is an AraC-like transcriptional regulator that plays a central role in *Salmonella* virulence. HilD controls the expression of the genes within the *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1), encoding a type 3 secretion system (T3SS), as well of several genes located outside SPI-1, which are mainly required for *Salmonella* invasion of host cells. The expression, amount and activity of HilD are tightly controlled by the activities of several factors. The Hile protein represses the expression of the SPI-1 genes through its interaction with HilD. In this study, we used genetic and biochemical assays to determine how Hile controls the transcriptional activity of HilD. We found that HilD needs to dimerize to induce expression of its target genes. Our results indicate that Hile interacts with each the central and the C-terminal regions of HilD, mediating dimerization and DNA binding, respectively. We also observed that these interactions consistently inhibit HilD dimerization and DNA binding. Additionally, we found that the amino acids Y180, F181 and F184, located in the central region of HilD, are directly involved in the interaction of HilD with Hile. Interestingly, computational analysis revealed that Hile shares sequence and structural similarities with Hcp proteins, which act as structural components of type 6 secretion systems (T6SS) in Gram-negative bacteria. Furthermore, we observed that the N-terminal region of HilD senses the effect of molecules that inhibit HilD activity, such as the short-chain fatty acids propionate and butyrate, the long-chain fatty acid oleate and the bile salt sodium deoxycolate, which are present in the intestine of humans and animals. In conclusion, our results uncover the molecular mechanism by which the Hcp-like protein Hile controls the activity of the virulence-promoting transcriptional regulator HilD. Our findings may indicate that Hile's activity represents a functional adaptation during the evolution of *Salmonella* pathogenicity. Additionally, our results reveal that the N-terminal region of HilD contains domains for

dimerization and for the sensing of molecules that *Salmonella* uses as signals to colonize a specific intestinal niche.

## 1. Introducción

### 1.1. El género *Salmonella*

El género *Salmonella* agrupa dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. Son bacterias Gram-negativas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* causantes de enfermedades en animales y humanos. *S. enterica* comprende seis subespecies y más de 2500 serovariedades, clasificadas de acuerdo a los antígenos O del lipopolidacárido y H del flagelo. Dependiendo de la serovariedad y del hospedero, *S. enterica* puede causar desde infecciones intestinales localizadas que producen diarrea, hasta infecciones sistémicas severas (Haraga et al., 2008; Sanchez-Vargas et al., 2011). *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) es específica de humanos y causa infección sistémica, también denominada fiebre tifoidea; en contraste, *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), en humanos y varios animales causa infección intestinal, pero en algunos animales causa infección sistémica. Debido a que *S. Typhimurium* puede ocasionar tanto la infección intestinal localizada como la infección sistémica, dependiendo de su hospedero, este serotipo se ha empleado como modelo para estudiar los mecanismos de patogenicidad de *S. enterica* (Haraga et al., 2008).

### 1.2. Mecanismos de patogenicidad

La infección por *Salmonella* empieza con la ingestión de agua y alimentos contaminados. Una vez dentro del hospedero, *Salmonella* es capaz de sobrevivir al pH ácido estomacal, mediante la activación de un mecanismo de tolerancia al ácido (Garcia-del Portillo et al., 1993). Asimismo, evade múltiples mecanismos de defensa del hospedero con el fin de alcanzar el epitelio del intestino delgado, donde invade células no fagocíticas, como los enterocitos y las células M (Haraga et al., 2008). *Salmonella* se adhiere a la superficie apical de las células epiteliales

intestinales a través de fimbrias y adhesinas e induce cambios en el citoesqueleto de las células hospederas que permiten su entrada a través de endocitosis. Simultáneamente, se desencadena una respuesta inflamatoria local, con el reclutamiento de macrófagos a la submucosa y al lumen intestinal, secreción de citocinas e incluso daño de las uniones estrechas celulares, que contribuyen a la aparición de la diarrea. Dentro de las células, *Salmonella* se aloja en las vacuolas contenedoras de *Salmonella* (SCV, del inglés *Salmonella*-containing vacuoles), las cuales son formadas durante el proceso de endocitosis y son el compartimiento en el que *Salmonella* sobrevive y se replica. Las SCV alcanzan la superficie basolateral y atraviesan el epitelio intestinal, donde posteriormente pueden ser fagocitadas por macrófagos u otras células fagocíticas presentes en la submucosa. La migración de las células fagocíticas infectadas facilita la diseminación de la bacteria a través de la vía linfática, así como sanguínea, alcanzando órganos como el hígado y el bazo, donde este patógeno se replica preferencialmente (Fabrega and Vila, 2013; Haraga et al., 2008).

### **1.3. Factores de virulencia de *S. enterica***

*Salmonella* posee diversas estrategias que le permiten invadir las células hospederas, así como evadir diversos mecanismos de la respuesta inmune para sobrevivir dentro del hospedero. La mayor parte de los genes que codifican para los factores de virulencia, se encuentran en regiones del cromosoma denominadas islas de patogenicidad, pero además pueden encontrarse codificados en otras regiones del cromosoma o en plásmidos.

#### **1.3.1. Flagelo**

Es una estructura filamentosa requerida para la movilidad, quimiotaxis y otras funciones importantes para la patogénesis bacteriana. La función flagelar requiere de la expresión de más de 50 genes organizados en diversos operones, que es regulada a diferentes niveles en respuesta a

señales ambientales. El flagelo permite a la bacteria llegar al sitio donde debe invadir y establecerse (Chilcott and Hughes, 2000; Fabrega and Vila, 2013).

### **1.3.2. Plásmidos**

Algunas serovariedades de *Salmonella* contienen un plásmido específico de virulencia. En el caso de *S. Typhimurium*, este plásmido se denomina pSLT y tiene un tamaño aproximado de 95 kb; contiene el locus *spvRABCD* que codifica los efectores SpvB y SpvC, los cuales inhiben la polimerización de la actina, la apoptosis y la respuesta inflamatoria del hospedero. Asimismo, el plásmido pSLT codifica para SpvA, una proteína de membrana externa, y para SpvD, una proteína secretada cuya función es desconocida, así como para el regulador transcripcional de tipo LysR, SpvR, el cual se autoregula y activa la expresión de los demás genes del operón (Fabrega and Vila, 2013).

### **1.3.3. Adhesinas y fimbrias**

Se han descrito más de 13 locus fimbriales en *S. Typhimurium* LT2. Las fimbrias están involucradas en diversos procesos patogénicos como la adhesión a células epiteliales, acumulación del fluido intestinal y formación de biopelículas (Fabrega and Vila, 2013). La inactivación individual de los operones fimbriales altera poco la virulencia de *S. Typhimurium* en modelos de ratón. Sin embargo, una combinación de mutaciones en estos genes, evidencia el efecto sinérgico de las diferentes fimbrias durante la colonización intestinal en ratones (van der Velden et al., 1998).

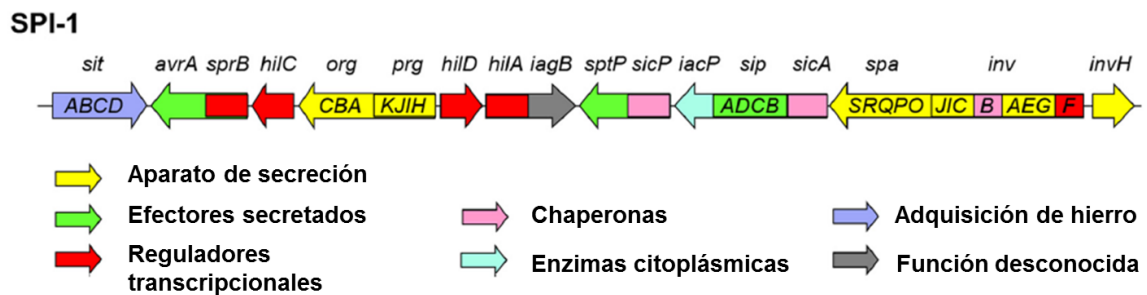
### **1.3.4. Islas de patogenicidad**

Son genes agrupados en ciertas regiones del cromosoma, adquiridos por transferencia horizontal. Las islas de patogenicidad codifican varios factores de virulencia, ausentes en cepas no patógenas o incluso en especies relacionadas. Se caracterizan por un contenido de G + C menor al resto del

genoma y un uso de codones diferente al del genoma central; están insertadas adyacentes a genes como los de los RNA de transferencia (RNAt) y asociadas con elementos genéticos móviles como integrasas, transposasas, fagos y orígenes de replicación (Gal-Mor and Finlay, 2006). En *Salmonella*, los genes de virulencia indispensables para la invasión a células hospederas y la patogénesis intracelular, se encuentran codificados dentro de islas de patogenicidad denominadas SPI's (del inglés, “*Salmonella* pathogenicity islands”). Hasta la fecha, se han descrito 23 islas de patogenicidad en el género *Salmonella*, las cuales pueden variar de acuerdo a la especie o a la serovariedad.

#### 1.3.4.1. SPI-1

SPI-1 se localiza en el centisoma 63 y está compuesta de 39 genes que abarcan una región cromosomal de 40 kb con un contenido de G + C de 44.97% (Que et al., 2013). Está presente en todas las serovariedades y en las distintas subespecies de *S. enterica* (Fookes et al., 2011). Los genes presentes en esta isla codifican un sistema de secreción tipo 3 (SST3-1), reguladores, chaperonas y proteínas efectoras, las cuales juegan un papel fundamental en la invasión de *Salmonella* a las células del hospedero (figura 1).



**Figura 1.** SPI-1 de *Salmonella enterica* (tomado y modificado de Fabrega y Vila, 2013).

El SST3-1 es un complejo multiproteico similar a una jeringa, el cual inyecta proteínas efectoras desde la bacteria al citoplasma de la célula hospedera. Está evolutivamente

relacionado con el sistema de exportación flagelar y está compuesto de un cuerpo basal que atraviesa las membranas celulares, un complejo similar a una aguja que se extiende desde la membrana externa, y un translocón que forma el poro en la membrana de la célula hospedera y que está asociado con la punta de la aguja (Moest and Meresse, 2013). Los operones *prg/org* e *inv/spa*, codifican el cuerpo basal y el complejo de la aguja y los operones *sic/sip*, codifican el translocón y las proteínas efectoras. Además, diversas chaperonas están codificadas dentro de SPI-1, las cuales impiden la degradación o interacciones prematuras de las proteínas efectoras y ayudan a su reconocimiento por el SST3-1 (Fabrega and Vila, 2013; Moest and Meresse, 2013; Que et al., 2013). Una vez que los efectores son secretados al citoplasma de la célula hospedera, dirigen el rearrreglo de la actina del citoesqueleto y modifican diferentes rutas de transducción de señales, que inducen la formación de proyecciones en la membrana, permitiendo la invasión de la bacteria a las células hospederas y el desarrollo de la respuesta inflamatoria intestinal (Fabrega and Vila, 2013; Haraga et al., 2008).

Además de su importante papel en la invasión a las células del hospedero, el SST3-1 también participa en la replicación intracelular y en la evasión de la respuesta inmune del hospedero, que permiten la supervivencia intracelular de *Salmonella*. SopB es un efector translocado a través del SST3-1, tiene actividad de fosfatasa fosfoinosítido y modifica la carga de la membrana de las SCV nacientes, impidiendo su fusión con el lisosoma (Bakowski et al., 2010). Asimismo, SptP es otro efector que además de inducir cambios en el citoesqueleto de la célula hospedera, también se asocia con las SCV, incrementando la replicación intracelular de *Salmonella* (Humphreys et al., 2009).



Adicionalmente, *S. enterica* expresa otro SST3, cuyos genes se encuentran codificados en SPI-2 (SST3-2), el cual está involucrado en la replicación y sobrevivencia intracelular dentro de los macrófagos y por lo tanto es necesario para la infección sistémica (Hansen-Wester and Hensel, 2001; Haraga et al., 2008; Hensel, 2004). La expresión de los genes que codifican este SST3-2, es inducida en ambientes que semejan las condiciones encontradas intracelularmente, como baja osmolaridad, baja concentración de cationes divalentes y pH ácido (Marcus et al., 2000), y su expresión es regulada principalmente por el sistema de dos componentes SsrA/SsrB (Bustamante et al., 2008)

#### **1.4. Regulación de la expresión de los genes de SPI-1**

Las bacterias patógenas requieren regular sus factores de virulencia para expresarlos en el tiempo y nicho adecuados durante el curso de una infección. En sustento de su importante papel en la patogénesis, los genes de SPI-1 se expresan cuando *Salmonella* se encuentra principalmente en el lumen del intestino o asociada al epitelio intestinal (Laughlin et al., 2014), en respuesta a señales ambientales como bajas concentraciones de oxígeno, alta osmolaridad, pH ligeramente alcalino, concentración de ácidos grasos, bilis, entre otros (Eade et al., 2016; Fabrega and Vila, 2013; Hung et al., 2013; Lawhon et al., 2002). *In vitro*, los genes de SPI-1 se expresan durante la fase estacionaria temprana cuando *Salmonella* es crecida en medios ricos en nutrientes como LB (Bustamante et al., 2008; Kroger et al., 2013; Lundberg et al., 1999; Miao and Miller, 2000).

La expresión de los genes de SPI-1 es controlada por una compleja red de regulación que involucra a varios reguladores codificados dentro y fuera de esta isla (Fabrega and Vila,

2013). Los reguladores HilD, HilA e InvF, codificados en SPI-1, actúan en cascada para inducir la expresión de los genes de esta isla: HilD es un regulador transcripcional de la familia AraC/Xyls que induce directamente la expresión de HilA, el cual a su vez induce la expresión de InvF; HilA e InvF activan la expresión de los genes que codifican para el SST3-1 y las proteínas efectoras de SPI-1, respectivamente (Fabrega and Vila, 2013; Golubeva et al., 2012). HilD induce la expresión de HilA, directamente o a través de un circuito de regulación positiva que forma con HilC y RtsA (Ellermeier et al., 2005). HilC y RtsA son reguladores transcripcionales de la familia AraC/XylS que unen la misma secuencia de DNA que HilD (Olekhovich and Kadner, 2007); HilC está codificado en SPI-1, mientras que RtsA está codificado en otra isla (Ellermeier and Slauch, 2003). HilD también controla la expresión de muchos otros genes de virulencia localizados fuera de SPI-1, incluyendo genes adquiridos y genes ancestrales, directa o indirectamente a través de HilA, InvF u otros reguladores, estableciéndose de esta manera una asociación del papel de estos genes a la función de SPI-1 (Bustamante et al., 2008; Colgan et al., 2016; Cordero-Alba and Ramos-Morales, 2014; Main-Hester et al., 2008; Martinez-Flores et al., 2016; Martinez et al., 2014a; Petrone et al., 2014; Singer et al., 2014; Smith et al., 2016; Thijs et al., 2007).

#### **1.4.1. Reguladores clave de la expresión de los genes de SPI-1**

##### **HilA**

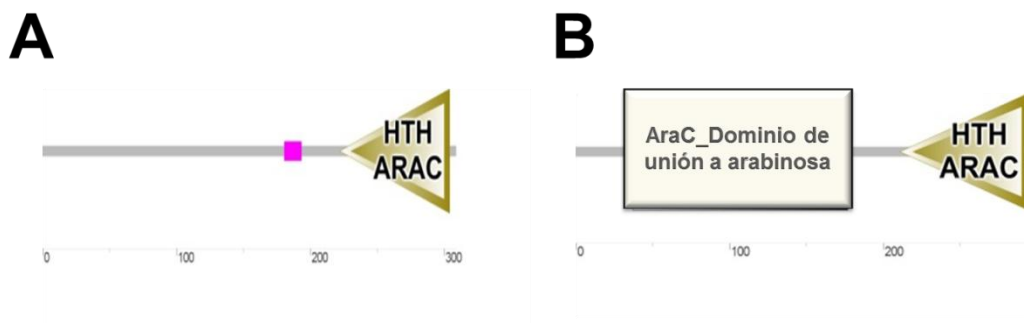
Es un activador transcripcional perteneciente a la familia OmpR/ToxR, codificado en SPI-1 (figura 1). Es un regulador importante para la invasión. Activa la expresión de los operones *prg/ogr* e *inv/spa* codificados dentro de la misma isla e importantes para el ensamble del SST3-1. Asimismo, HilA activa la expresión de genes que codifican para

efectores del SST3-1 localizados en otras islas de patogenicidad, como SPI-4 y SPI-5 (Bajaj et al., 1995; Fabrega and Vila, 2013; Thijs et al., 2007).

## **HilD**

Es considerado el regulador principal de SPI-1. HilD se une al promotor de *hilA* e induce su expresión al contrarrestar la represión mediada por el regulador H-NS sobre este gen (Boddicker et al., 2003; Ellermeier et al., 2005). Como se mencionó anteriormente, junto con HilC y RtsA forman un circuito de regulación que amplifica la señal para inducir la expresión de HilA; sin embargo, se ha visto que la pérdida de HilD tiene un efecto dominante sobre la transcripción de *hilA*, comparado con el efecto de HilC y RtsA (Ellermeier et al., 2005).

HilD es un miembro de la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS, los cuales tienen homología en su región carboxilo terminal (C-terminal) que contiene el dominio de unión a DNA (figura 2A). Este dominio se caracteriza por tener dos motivos de unión de hélice vuelta hélice (HTH) que comprenden aproximadamente 100 aminoácidos (Gallegos et al., 1997). Aunque los miembros de la familia AraC presentan homología en su dominio de unión a DNA, la secuencia que reconocen no es la misma. Existe un mayor grado de identidad en el segundo motivo HTH que en el primero entre estas proteínas, lo cual podría indicar que el segundo HTH está involucrado en alguna interacción común y que el primero determina la especificidad de unión al DNA (Gallegos et al., 1997). }



**Figura 2. Predicción de dominios por medio de SMART (simple modular architecture research tool). A. HilD. B. AraC.**

En contraste con la identidad que presentan en la región C-terminal, la secuencia de la región amino terminal (N-terminal) es diferente para cada regulador y se ha asociado con el reconocimiento de señales ambientales que determinan su activación o inhibición, así como su dimerización. Por ejemplo, AraC, en su región N-terminal tiene un dominio de detección de arabinosa y un dominio de dimerización (figura. 2B) (Gallegos et al., 1997; Schleif, 2010). Asimismo, se ha demostrado que otros reguladores de la familia AraC también dimerizan por su región N-terminal, como ToxT, UreR, ExsA, AggR, XylS, entre otros (Brutinel et al., 2009; Parra and Collins, 2012; Prouty et al., 2005; Ruiz et al., 2003; Santiago et al., 2016).

Dada su importancia como regulador central de genes de virulencia, la expresión, concentración y actividad de HilD está altamente controlada (Fabrega and Vila, 2013; Golubeva et al., 2012; Martinez et al., 2011). La transcripción de *hilD* se reprime por el regulador H-NS y se auto-activa positivamente (Ellermeier et al., 2005; Olekhovich and Kadner, 2007), mientras que la traducción del RNAm de *hilD* se reprime por el regulador CsrA (Martinez et al., 2011). Asimismo, la concentración de HilD se controla por la proteasa Lon (Boddicker and Jones, 2004; Takaya et al., 2005). Además, la actividad de

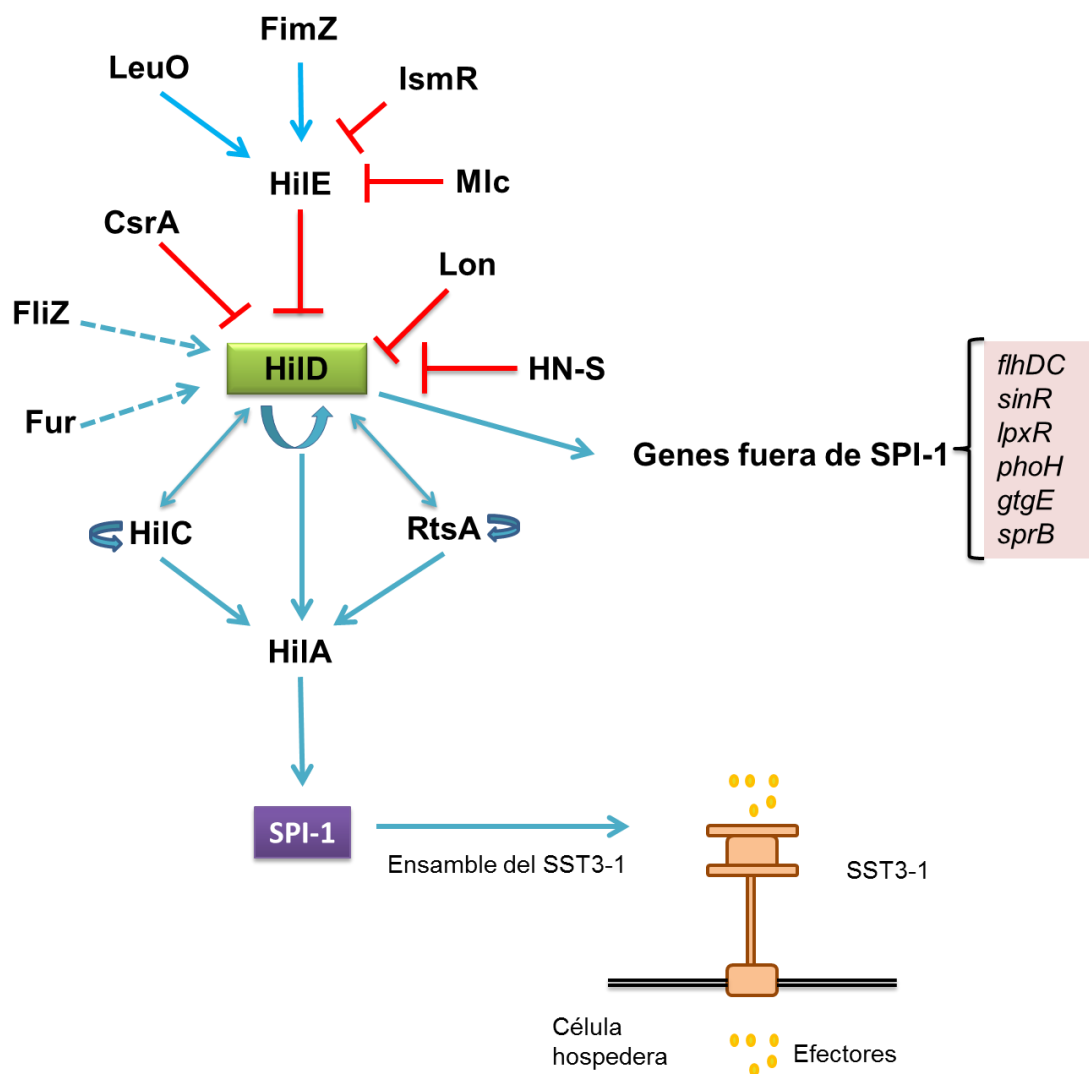
HilD se regula positivamente por FliZ y Fur, a través de mecanismos aún desconocidos (Chubiz et al., 2010; Ellermeier and Slauch, 2008) y negativamente por su interacción con la proteína HilE (Baxter et al., 2003) (figura 3). Asimismo, modificaciones postraduccionales, como la acetilación, afectan la estabilidad de HilD (Hung et al., 2016; Sang et al., 2016). No obstante, su efecto aún es controvertido; algunos autores sugieren que la acetilación aumenta la estabilidad de HilD (Sang et al., 2016) mientras que otros sugieren que la disminuye (Hung et al., 2016).

### **HilC, RtsA, InvF**

HilC, RtsA e InvF son otros tres reguladores tipo AraC de *S. enterica* que también participan en la regulación de los genes de SPI-1 y genes relacionados. Como se mencionó anteriormente, HilC y RtsA forman un circuito de regulación positiva con HilD para activar la expresión de *hilA* (Ellermeier et al., 2005); se unen a los mismos sitios de las regiones promotoras descritas para HilD (Olekhnovich and Kadner, 2007; Singer et al., 2014) y también antagonizan la represión transcripcional mediada por H-NS (Olekhnovich and Kadner, 2007). InvF en complejo con la chaperona SicA regula la expresión de los operones *sic/sip* que codifican proteínas chaperonas y efectores secretados del SST3-1, respectivamente. Asimismo, regula la expresión de *sopE* y *sigD*, dos efectores codificados fuera de SPI-1 (Darwin and Miller, 2000; Eichelberg and Galan, 1999). HilC e InvF están codificados dentro de SPI-1, mientras que RtsA está codificado en una isla cromosomal de 15 kb de *Salmonella* (Ellermeier and Slauch, 2003). Estos reguladores comparten homología en su dominio C-terminal con los reguladores tipo AraC. Se desconoce la función de su región N-terminal, si participa en el reconocimiento de señales específicas o en la formación de oligómeros.

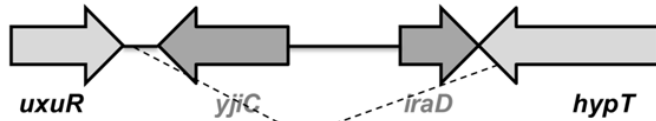
## **HilE**

HilE es una proteína de 148 aminoácidos, codificada en un gen localizado en una región similar a una isla de patogenicidad, en el cromosoma de *Salmonella sp.* (figura 4). Es importante para controlar la expresión de los genes de SPI-1, a través de la regulación negativa de HilD (Baxter et al., 2003). La expresión de HilE es regulada positivamente por FimZ, un regulador transcripcional de los genes que codifican para la fimbria tipo I, cuya expresión es a su vez regulada por los sistemas de dos componentes PhoPQ y PhoBR (Baxter and Jones, 2005; Baxter and Jones, 2015). Asimismo, la transcripción de *hilE* es inducida por LeuO, un regulador de tipo LysR, el cual se une a la región promotora de *hilE* (Espinosa and Casadesus, 2014), y reprimida por Mlc, un regulador global de la captación de azúcares, el cual une al promotor 3 de *hilE* (Lim et al., 2007). De manera interesante, la traducción de HilE es controlada negativamente por IsrM, un RNA pequeño presente en una isla de patogenicidad de *Salmonella* (Gong et al., 2011), así como por la unión directa de CsrA al RNAm (datos no publicados).



**Figura 3. Cascada de regulación de los genes de SPI-1.** Las líneas azules continuas representan la activación de la expresión de los genes; las líneas azules punteadas indican que se desconoce el mecanismo de activación y las líneas rojas indican represión.

*E. coli* MG1655

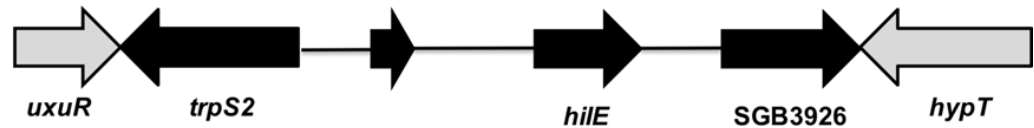


*S. Typhimurium* SL1344



% G + C	54.6	52.9	33.3	49.2	55.6	52.3
---------	------	------	------	------	------	------

*S. bongori* NCTC 12419



**Figura 4.** El gen *hilE* está localizado en una isla genómica de *S. Typhimurium* y *S. bongori* que está ausente en *E. coli* K-12. Representación esquemática de la región de DNA entre los genes ancestrales *uxuR* y *hypT* en *E. coli* K-12 MG1655, *S. Typhimurium* SL1344 y *S. bongori* NCTC 12419. El gen *hilE* está presente en *S. Typhimurium* y *S. bongori*, pero no en *E. coli* K-12. Los genes *trpS2*, *SL1344\_4438* and *SL1344\_4431* que codifican para una triptofanil-tRNA sintetasa, una proteína hipotética y una aspartato racemasa putativa, respectivamente. El contenido de G + C de cada uno de los genes de *S. Typhimurium* SL1344 está indicado en la figura.



## 2. Antecedentes

### 2.1. Interacción de HilD con HilE

HilE fue identificado inicialmente como un regulador negativo de la expresión de *hilA*, mediante mutagénesis al azar por transposición (Fahlen et al., 2000). Posteriormente, la delección y la sobreexpresión del gen *hilE* confirmaron el efecto sobre la expresión de los genes de SPI-1 (Baxter et al., 2003). Para determinar el mecanismo por el cual HilE regulaba la expresión de los genes de SPI-1, Baxter y cols, estudiaron diversas posibilidades. Primero, analizaron la secuencia de HilE en las bases de datos para buscar proteínas similares con funciones conocidas, pero no encontraron ortólogos; segundo, se exploró si HilE podría unirse a la región promotora de *hilA* y de esta manera reprimir la expresión de los genes de SPI-1, por un mecanismo similar al usado por las proteínas similares a histonas como Hha o H-NS, pero no se pudo detectar la unión de la proteína HilE purificada a *hilA*. Asimismo, se analizó si HilE regulaba negativamente la transcripción de *hilD*, pero sus resultados indicaron que el mecanismo de regulación sobre *hilD* era postranscripcional, por lo cual, finalmente se investigó si HilE podría interactuar con HilD usando el sistema de dos híbridos en bacterias basado en LexA. Este sistema genético para el estudio de la interacción proteína-proteína, aprovecha la habilidad de LexA de reprimir la expresión del gen *sulA* sólo cuando forma dímeros (Daines and Silver, 2000; Dmitrova et al., 1998). Esta propiedad permite remplazar el dominio de dimerización de LexA por dominios de homo o heterodimerización heterólogos que contribuyen a la recuperación de la función del represor *in vivo*. Cuando se fusionan dos proteínas que interactúan entre sí al dominio de unión al DNA de LexA, se recupera la capacidad de LexA de dimerizar y por lo tanto de reprimir la expresión de *sulA*. HilE y HilD fueron fusionados al dominio de unión a DNA de LexA, y

posteriormente se midió la represión de *sulA* mediada por LexA, evidenciándose por primera vez la interacción proteína-proteína de Hild con Hile (Baxter et al., 2003).

## **2.2. Efecto de compuestos producidos por la microbiota sobre la expresión de los genes de SPI-1**

Estudios recientes indican que uno de los principales factores de resistencia a la colonización intestinal por patógenos es la microbiota. *Salmonella* induce inflamación intestinal aguda como estrategia para desplazar a la microbiota. Para esto cuenta con mecanismos que le permiten evadir diferentes respuestas antimicrobianas que se generan en el intestino inflamado, lo cual hace a esta bacteria más competitiva que la microbiota en su capacidad de sobrevivencia y replicación en este medio ambiente (Ahmer and Gunn, 2011; Antunes et al., 2014; Peixoto et al., 2017; Rivera-Chavez et al., 2016; Santos, 2014; Thiennimitr et al., 2012). Compuestos derivados del metabolismo de las bacterias de la microbiota pueden favorecer o no la colonización e invasión por *S. Typhimurium*. Moléculas derivadas de especies de *Clostridium* y compuestos aromáticos provenientes del microbioma fecal reprimen la expresión de genes de invasión de *S. Typhimurium* (Antunes et al., 2014; Peixoto et al., 2017). Los ácidos grasos de cadena corta presentes en el intestino se han asociado con resistencia a la colonización por *Salmonella* en dependencia de sus concentraciones. La depleción de especies de *Clostridium* productoras de butirato incrementa el crecimiento aeróbico y la expansión intestinal de *Salmonella* (Rivera-Chavez et al., 2016). El butirato afecta la interacción de *S. enterica* con las células epiteliales intestinales de pollo, disminuyendo la tasa de invasión (Van Immerseel et al., 2004). De hecho, se ha usado comercialmente para disminuir la colonización en pollos y protegerlos de la infección por *S. Enteritidis* (Van Immerseel et al., 2005). Adicionalmente, un análisis transcriptómico por

microarreglos reveló que el butirato disminuye la expresión de los genes de SPI-1 de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* asociados con la invasión, como los que codifican los reguladores transcripcionales HilA y HilD (Gantois et al., 2006). Asimismo, el propionato derivado de especies de *Bacteroides* presentes en la microbiota intestinal, representa un mecanismo importante de resistencia a la colonización por *S. enterica*, al disminuir el crecimiento de este patógeno debido a cambios en la homeóstasis del pH intracelular de la bacteria (Jacobson et al., 2018). De manera interesante, el propionato también regula la estabilidad de HilD por un mecanismo independiente de la proteasa Lon, lo cual podría sugerir una unión de HilD a propionato (Hung et al., 2013). También se ha visto que ácidos grasos de cadena larga insaturados, como el oleato, y saturados, como el miristato y palmitato, tienen efectos negativos sobre la expresión de los genes de SPI-1. Particularmente, el oleato inhibe la unión de HilD a su DNA blanco (Golubeva et al., 2016). Por otro lado, las sales biliares reprimen la expresión de los genes de SPI-1 mediante la disminución de la estabilidad de la proteína HilD (Eade et al., 2016).

En contraste con las señales inhibitorias mencionadas anteriormente, se han descrito otras señales que activan la expresión de los genes de SPI-1. El acetato, un ácido graso de cadena corta encontrado naturalmente en el intestino de humanos y animales, activa la expresión de los genes de SPI-1 a través del sistema de dos componentes BarA/SirA (Altier et al., 2000; Chavez et al., 2010; Lawhon et al., 2002), promoviendo indirectamente la expresión de HilD (Martinez et al., 2011). El acetyl-fosfato, un derivado del metabolismo del acetato puede fosforilar al regulador de respuesta SirA o al sensor cinasa BarA o ambos, y de esta manera activar la expresión de CsrB y CsrC, dos moléculas de RNA que unen y secuestran a la proteína de unión a RNAm CsrA, que como se mencionó anteriormente une al RNAm de HilD reprimiendo su traducción (Lawhon et al., 2002; Martinez et al., 2011). Por lo tanto, la activación de esta cascada de señalización

inducida por el acetato, conlleva a la disminución de la cantidad de CsrA libre, permitiendo la expresión de HilD y por consiguiente de los genes de invasión de *S. enterica*. Igualmente, el formato, otro ácido graso presente en el intestino, induce la expresión de HilD por mecanismos desconocidos, y constituye otra señal de activación de la expresión de los genes de SPI-1 (Huang et al., 2008).

De manera interesante, se ha demostrado que el acetato y el formato son predominantes en la porción distal del intestino delgado (íleon), donde *Salmonella* infecta, mientras que el butirato y el propionato se encuentran en mayor concentración en el colon y el ciego, donde la expresión de los genes de invasión está reprimida (Huang et al., 2008; Lawhon et al., 2002). Asimismo la bilis es secretada en la porción proximal del intestino, reprimiendo la invasión de *S. enterica* (Eade et al., 2016). Estos hallazgos sugieren que a su paso por el tracto intestinal, *Salmonella* encuentra diferentes señales ambientales que le permiten reconocer regiones específicas del tracto intestinal y expresar los genes de virulencia requeridos para la invasión en el sitio adecuado.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo general**

Caracterizar los dominios funcionales del regulador de virulencia HilD de *S. enterica* serovar Typhimurium.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Determinar el dominio de HilD que interacciona con HilE.
2. Determinar el posible dominio de dimerización de HilD.
3. Determinar el mecanismo por el cual HilE regula a HilD.
4. Definir aminoácidos involucrados en la interacción específica de HilD con HilE.
5. Determinar si la región N-terminal de HilD está involucrada en la detección de señales inhibitorias como el propionato, butirato, oleato y sales biliares.

## 4. Métodos

### 4.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio están listadas en la tabla 1. Las bacterias fueron crecidas en medio líquido LB (del inglés, Lysogenic broth), el cual contiene 0.1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura y 0.1% de NaCl, ajustado a pH 7.5. Cuando fue necesario, los medios fueron suplementados con antibióticos: ampicilina (200 µg/ml), estreptomicina (100 µg/ml), tetraciclina (12 µg/ml) o kanamicina (20 µg/ml).

**Tabla 1. Cepas bacterianas usadas en este estudio**

Cepa	Genotipo o descripción	Referencia
Cepas de <i>S. Typhimurium</i>		
SL1344	Silvestre; <i>xyl hisG rpsL</i> ; Sm <sup>R</sup>	(Hoiseth and Stocker, 1981)
14028s	Silvestre	ATCC
JPTM25	$\Delta hilD$	(Martinez et al., 2011)
$\Delta hilD_{130-309}::kan$	$\Delta hilD_{130-309}::kan$	Este estudio
Cepas de <i>E. coli</i> K-12		
DH5 $\alpha$	Cepa de laboratorio	Invitrogen
SU101	Cepa reportera del sistema genético basado en LexA para ensayos de homodimerización; Kan <sup>R</sup>	(Dmitrova et al., 1998)
SU202	Cepa reportera del sistema genético basado en LexA para ensayos de heterodimerización; Kan <sup>R</sup>	(Dmitrova et al., 1998)
BL21/DE3	Cepa para la expresión de	Invitrogen

	proteínas recombinantes	
MC4100	Cepa para clonación	(Casadaban, 1976)

Ap<sup>R</sup>, ampicilina resistente; Sm<sup>R</sup> estreptomicina resistente; Kan<sup>R</sup>, kanamicina resistente; Tc<sup>R</sup>, tetraciclina resistente.

#### 4.2. Construcción de plásmidos

Los plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este estudio están listados en las tablas 2 y 3, respectivamente. Para construir los plásmidos pSR658-HilD1, pSR658-HilD2, pSR658-HilD3, pSR658-HilD4 y pSR658-HilD5, fragmentos del gen *hilD* fueron amplificados por PCR usando el par de oligonucleótidos HilD-SacI/HilDexR-PstI, HilD-SacI/HilD-130, HilD130-2/HilDexR-PstI, HilD-SacI/HilD-220 and HilD-221/HilDexR-PstI, respectivamente. Los productos de PCR resultantes fueron digeridos con SacI y PstI y clonados en el vector pSR658 digerido con las mismas enzimas de restricción. Para construir el plásmido pSR658-HilD6, un fragmento de DNA que codifica para 35 aminoácidos del motivo de leucina “zipper” (LZ) de la proteína GCN4 de *Saccharomyces cerevisiae* fue amplificado usando los oligonucleótidos LZ-F y HilD221LZR, y DNA del plásmido pUT18C-zip. El fragmento de la región que codifica para HilD desde el aminoácido 221 al 309 (HilD<sub>221-309</sub>) fue amplificado por PCR usando los oligonucleótidos LZ-HilD221F y HilDexR-PstI. Después los productos resultantes, LZ y HilD<sub>221-309</sub>, fueron fusionados por “overlap extension PCR” usando los oligonucleótidos LZ-F y HilDexR-PstI. El producto obtenido fue digerido con XhoI y PstI y clonado en el vector pSR658 digerido con las mismas enzimas. Para construir el plásmido pSR658-HilD7, fragmentos de DNA que codifican para el gen *hilD*, fueron amplificados con oligonucleótidos que contienen cambios en la secuencia que introducen las mutaciones Y180A, F181A y F184A, HilD-SacI/HilDALA2-RV y

HilDALA2-FW/HilDexR-PstI. Después los productos resultantes fueron fusionados por “overlap extension PCR” usando los oligonucleótidos HilD-SacI y HilDexR-PstI. El producto obtenido fue digerido con SacI y PstI y clonado en el vector pSR658 digerido con las mismas enzimas. Para construir el plásmido pSR658-HilD8, fragmentos de DNA que codifican para el gen *hilD*, fueron amplificados con oligonucleótidos que contienen cambios en la secuencia que introducen las mutaciones L177A, I178A, HilD-SacI/HilDALA1-RV y HilDALA1-FW/HilDexR-PstI. Los productos resultantes fueron fusionados por “overlap extension PCR” usando los oligonucleótidos HilD-SacI y HilDexR-PstI. El producto obtenido fue digerido con SacI y PstI y clonado en el vector pSR658 digerido con las mismas enzimas. Para construir el plásmido pSR659-HilE1, el gen *hilE* fue amplificado por PCR usando el par de oligonucleótidos HilE-SacI y HilE-HindIII-3’. Los productos de PCR resultantes fueron digeridos con SacI y HindIII y clonados en el vector pSR659 digerido con las mismas enzimas de restricción. Para construir el plásmido pSR658-HilE1, el gen *hilE* fue amplificado por PCR usando el par de oligonucleótidos HilE-SacI y HilE-PstI. Los productos de PCR resultantes fueron digeridos con SacI y PstI y clonados en el vector pSR658 digerido con las mismas enzimas de restricción. Para construir los plásmidos pA6-HilE1 y pK6-HilE1, el gen *hilE* fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos HilE-NcoI-2 y HilE-His6. El producto de PCR obtenido fue digerido con NcoI y HindIII y clonado en el vector pMPM-A6Ω o pMPM-K6Ω, digerido con las mismas enzimas. Para construir el plásmido pET32-HilE que expresa la proteína de fusión Trx-His-HilE, el gen *hilE* fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos HilE-NcoI-2 y HilE-PUT-BamHI. El producto de PCR resultante fue digerido con NcoI y BamHI y clonado en el vector pET32b(+) digerido con las mismas enzimas de restricción. Para construir el plásmido p2795-HilD130, el fragmento del gen *hilD* que codifica para los aminoácidos 130-309 (HilD<sub>130-309</sub>) fue amplificado



por PCR usando el par de oligonucleótidos HilD130-5' y HilDPK-BamHI. El producto de PCR resultante fue digerido con SacI y BamHI y clonado en el vector p2795 digerido con las mismas enzimas de restricción.

**Tabla 2. Plásmidos usados en este estudio**

Plásmido	Genotipo o descripción	Referencia
pSR658	Vector que expresa LexA <sub>DBDwt</sub> para los ensayos de homodimerización; Tc <sup>R</sup>	(Daines and Silver, 2000)
pSR658-HilD1	Plásmido derivado del pSR658 que expresa la proteína de fusión LexA <sub>DBDwt</sub> -HilD <sub>1-309</sub> ; Tc <sup>R</sup>	Este estudio
pSR658-HilD2	Plásmido derivado del pSR658 que expresa la proteína de fusión LexA <sub>DBDwt</sub> -HilD <sub>1-130</sub> ; Tc <sup>R</sup>	Este estudio
pSR658-HilD3	Plásmido derivado del pSR658 que expresa la proteína de fusión LexA <sub>DBDwt</sub> -HilD <sub>130-309</sub> ; Tc <sup>R</sup>	Este estudio
pSR658-HilD4	Plásmido derivado del pSR658 que expresa la proteína de fusión LexA <sub>DBDwt</sub> -HilD <sub>1-220</sub> ; Tc <sup>R</sup>	Este estudio
pSR658-HilD5	Plásmido derivado del pSR658 que expresa la proteína de fusión LexA <sub>DBDwt</sub> -HilD <sub>221-309</sub> ; Tc <sup>R</sup>	Este estudio
pSR658-HilD6	Plásmido derivado del pSR658 que expresa la proteína de fusión LexA <sub>DBDwt</sub> -LZ-HilD <sub>221-309</sub> ; Tc <sup>R</sup>	Este estudio
pSR658-HNS	Plásmido derivado del pSR658 que expresa la proteína de fusión LexA <sub>DBDwt</sub> -H-NS; Tc <sup>R</sup>	(Martinez et al., 2011)
pSR658-HilD7	Plásmido derivado del pSR658 que expresa la proteína de fusión	Este estudio

	LexA <sub>DBDwt</sub> -HilD <sub>Y180A-F181A-F184A</sub>	
pSR658-HilD8	Plásmido derivado del pSR658 que expresa la proteína de fusión LexA <sub>DBDwt</sub> -HilD <sub>L177-1178</sub>	Este estudio
pSR658-HilE1	Plásmido derivado del pSR658 que expresa la proteína de fusión LexA <sub>DBDwt</sub> -HilE; Tc <sup>R</sup>	Este estudio
pSR659	Vector que expresa LexA <sub>DBDmut</sub> para los ensayos de heterodimerización; Ap <sup>R</sup>	(Daines and Silver, 2000)
pSR659-HilE1	Plásmido derivado del pSR659 que expresa la proteína de fusión LexA <sub>DBDmut</sub> -HilE fusion; Ap <sup>R</sup>	Este estudio
pMAL-c2x	Vector de expresión para la construcción de proteínas recombinantes fusionadas a la proteína de unión a maltosa (MBP), promotor <i>lac</i> ; Ap <sup>R</sup>	New England Biolabs
pMAL-HilD1	Plásmido derivado del pMAL-c2x que expresa la proteína de fusión MBP-HilD; Ap <sup>R</sup>	(Bustamante et al., 2008)
pMPM-A6Ω	Vector de clonación de bajo número de copias, p15A , promotor <i>ara</i> ; Ap <sup>R</sup>	(Mayer, 1995)
pA6-HilE1	Plásmido derivado del pMPM-A6Ω que expresa HilE; Ap <sup>R</sup>	Este estudio
pMPM-K6Ω	Vector de clonación de bajo número de copias, p15A , promotor <i>ara</i> ; Kan <sup>R</sup>	(Mayer, 1995)
pK6-HilE1	Plásmido derivado del pMPM-K6Ω que expresa HilE; Kan <sup>R</sup>	Este estudio
pUT18C-zip	Vector que expresa 35 aminoácidos del motivo de leucina zipper de GCN4 fusionado en fase con el fragmento T18 de CyA; Ap <sup>R</sup>	Euromedex

pET32b(+)	Vector de expresión para la construcción de proteínas recombinantes fusionadas a Tiorredoxina (Trx), promotor T7; Ap <sup>R</sup>	Novagen
pET32-HilE	Plásmido derivado del pET32b(+) que expresa Trx-HilE; Ap <sup>R</sup>	Este estudio
pBAD-HilD1	Plásmido derivado del pBADMyHis que expresa HilD-MyHis; Ap <sup>R</sup>	(Martinez et al., 2011)
philA-cat1	Plásmido derivado del pKK232-8 que expresa la fusión transcripcional <i>hilA-cat</i> desde los nucleótidos - 410 al + 446	(Bustamante et al., 2008)
p2795	Plasmido pBluescript SK + que contiene <i>aph</i> , FRT; Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(Husseiny and Hensel, 2005)
p2795-HilD130	Plásmido derivado del p2795 que expresa a HilD <sub>130-309</sub> ; Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Este estudio
pKD46	Plásmido derivado del pINT-ts que expresa la recombinasa $\lambda$ red, bajo un promotor inducible por arabinosa; Ap <sup>R</sup>	(Datsenko and Wanner, 2000)

Ap<sup>R</sup>, ampicilina resistente; Sm<sup>R</sup> estreptomicina resistente; Kan<sup>R</sup>, kanamicina resistente; Tc<sup>R</sup>, tetraciclina resistente.

**Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este estudio**

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Gen blanco	ER
HilD-SacI	GAT <u>GAG CTC</u> GAA AAT GTA ACC TTT GTA AGT AAT AG	<i>hilD</i>	SacI
HilDexR-PstI	TCC <u>CTG CAG AAC</u> AAT GAT ATT GAA TAG C	<i>hilD</i>	PstI
HilD130-5'	CCC ACA <u>GAG CTC</u> GCG CAG AAG ATC TTC TAT ACG	<i>hilD</i>	SacI
HilD-130	ATA GAA <u>CTG CAG</u> TTA CGC TTT CTC TGT	<i>hilD</i>	PstI

	GGG TAC CG		
HilD-220	AAG CTT <u>CTG CAG</u> TTA ACT GGG TGA CGA AGA TAT AAT G	<i>hilD</i>	PstI
HilD-221	TCG TCA <u>GAG CTC</u> AGA CAG TGG AAG CTT ACG GAT G	<i>hilD</i>	SacI
LZ-F	GTA <u>CTC GAG</u> CAG CGT ATG AAA CAG CTG GAA G	<i>gcn4*</i>	XhoI
LZ-HilD221F	GAA AAA ACT GGT GGG TGA ACG TAG ACA GTG GAA GCT TAC GGA TG	<i>gcn4*</i>	
HilD221LZR	CAT CCG TAA GCT TCC ACT GTC TAC GTT CAC CCA CCA GTT TTT TC	<i>hilD</i>	
HilE-SacI	GGG <u>GAG CTC</u> GAC GCC ATC TAT TTA AAA CTG G	<i>hilE</i>	SacI
HilE- HindIII-3'	TCC <u>GCA AGC TTG</u> TTT TGT CC	<i>hilE</i>	HindIII
HilE-NcoI-2	GAG GGG <u>CCA TGG</u> ACG CCA TCT ATT TAA AAC TGG	<i>hilE</i>	NcoI
HilE-PstI	CCT CTG CAG GCA ATC GAT TGG TTA CAT G	<i>hilE</i>	PstI
HilE-His6	CCC <u>AAG CTT</u> TCC TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG TCG CCA CAG CGC CTG TCG G	<i>hilE</i>	HindIII
HilE-PUT-BamHI	ATA ACG <u>GAT CCG</u> AGG GCC ACG CGT TAT CGC	<i>hilE</i>	BamHI
HilCRR-F	GGA ATG TAA TTA TTG GCT ATA ATA ATA AAA AAA TCG GAT TTA AAT CAT CT	<i>hilC</i>	
HilCRR-R	GAG ATG ATT TAA ATC CGA TTT TTT TAT TAT TAT AGC CAA TAA TTA CAT TC	<i>hilC</i>	
HilDALA1-F	CAA AAG TTG TAT TGA AAA TGA AGA GGC TGC TCC TTA TTT TCT GCT GTT CCT	<i>hilD</i>	

	GCT TAC TGC		
HilDALA1-R	GCA GTA AGC AGG AAC AGC AGA AAA TAA GGA GCA GCC TCT TCA TTT TCA ATA CAA CTT TTG	<i>hild</i>	
HilDALA2-FW	GTA TTG AAA ATG AAG AGT TAA TTC CTG CTG CTC TGC TGG CTC TGC TTA CTG CTT TTC TCC GAC TC	<i>hild</i>	
HilDALA2-RV	GAG TCG GAG AAA AGC AGT AAG CAG AGC CAG CAG AGC AGC AGG AAT TAA CTC TTC ATT TTC AAT AC	<i>hild</i>	
HilDPK-BamHI	GCC <u>TCG GAT CCT</u> AGT AGA GCG TGT TAA TG	<i>hild</i>	BamHI
HilD228	CCG GGA TCC ACA CAG GGA TTC CTG ATG AAA ATA G	<i>hild</i>	
HilD160	GTT ACT <u>CTG CAG</u> TTA GCT TGT ATC CTT CGT ACA GGA G	<i>hild</i>	PstI
R-FW	CAG TAA GGA ACA TTA AAA TAA CAT CAA CAA AGG GAT AAT ATG GCG CAG AAG ATC TTC TAT ACG	<i>hild</i>	
R-RV	TCA GTA TAA GCT GTC TTC CGG ACA GAA CAA TGA TAT TGA ATA CGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC	<i>hild</i>	
K2	CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC	<i>aph</i>	

ER, enzima de restricción para la cual fue generado un sitio en el oligonucleótido. Las letras subrayadas indican el sitio respectivo para cada enzima. \* *gcn4* codificado en el plásmido pUT18C-zip (Tabla 2).

### 4.3. Ensayos de dimerización de HilD

Para probar si HilD dimeriza, los plásmidos pSR658, pSR658-HilD1 o pSR658-HNS fueron transformados a la cepa reportera *E. coli* SU101 usada para ensayos de homodimerización, la

cual contiene en su cromosoma la fusión transcripcional *sulA-lacZ* (Daines and Silver, 2000; Dmitrova et al., 1998). Por otro lado, para determinar el dominio de HilD involucrado en la dimerización, los plásmidos pSR658, pSR658-HilD1, pSR658-HilD2, pSR658-HilD3, pSR658-HilD4 o pSR658-HilD5, también fueron transformados en la misma cepa reportera *E. coli* SU101. Asimismo, para determinar si HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> y HilD<sub>L177A-I178</sub> dimerizan, los plásmidos pSR658-HilD7 y pSR658-HilD8, fueron transformados en la cepa reportera de *E. coli* SU101. Las bacterias transformantes fueron cultivadas en LB con tetraciclina y 1 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) para inducir la expresión de LexA<sub>DBDwt</sub> y las proteínas de fusión LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-130</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>130-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>L177A-I178</sub> respectivamente. Los cultivos fueron incubados a 37°C en agitación hasta una D.O<sub>600</sub> de 1.0 y posteriormente fueron usados para determinar la actividad de β-galactosidasa.

Para probar si Hile afecta la dimerización de HilD, la cepa reportera de *E. coli* SU101 fue primero transformada con los plásmidos pSR658, pSR658-HilD1, pSR658-HNS o pSR658-HilD6; y luego fueron transformados con el vector pMPM-A6Ω o con el plásmido pA6-Hile1 que expresa a Hile a partir de un promotor inducible por arabinosa. Las bacterias transformantes fueron crecidas en LB con tetraciclina, ampicilina y 1 mM de IPTG para inducir la expresión de LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS y LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub>. También fue adicionado 0.1% de L-Arabinosa al medio de cultivo para inducir la expresión de Hile. Los cultivos fueron incubados a 37°C en agitación hasta una D.O<sub>600</sub> de 1.0 y posteriormente fueron usados para determinar la actividad de β-galactosidasa.

#### **4.4. Ensayo de interacción de HilD con HilE**

Para probar la interacción entre HilD y HilE, la cepa reportera de *E. coli* SU202 del sistema genético basado en LexA, la cual contiene una fusión transcripcional *sulA-lacZ* con un operador híbrido, fue primero transformada con los plásmidos pSR658, pSR658-HilD1, pSR658-HilD2, pSR658-HilD4, pSR658-HilD5 o pSR658-HilD7 y posteriormente con el vector pSR659 o el plásmido pSR659-HilE1. Las bacterias transformantes fueron crecidas en LB con tetraciclina, ampicilina y 1 mM de IPTG para inducir la expresión de LexA<sub>DBD</sub>, LexA<sub>DBD</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBD</sub>-HilD<sub>1-130</sub>, LexA<sub>DBD</sub>-HilD<sub>1-220</sub>, LexA<sub>DBD</sub>-HilD<sub>221-309</sub>, LexA<sub>DBD</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub>, LexA<sub>DBDmut</sub> y LexA<sub>DBDmut</sub>-HilE. Los cultivos fueron incubados a 37°C en agitación hasta una D.O<sub>600</sub> de 1.0 y posteriormente fueron usados para determinar la actividad de β-galactosidasa.

#### **4.5. Ensayo dimerización de HilE**

Para probar si HilE dimeriza, los plásmidos pSR658, pSR658-HilE1 o pSR658-HNS fueron transformados a la cepa reportera *E. coli* SU101, la cual contiene en su cromosoma la fusión transcripcional *sulA-lacZ* (Daines and Silver, 2000; Dmitrova et al., 1998). Las bacterias transformantes fueron cultivadas en LB con tetraciclina y 1 mM de IPTG para inducir la expresión de LexA<sub>DBDwt</sub> y las proteínas de fusión LexA<sub>DBDwt</sub>-HilE y LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS. Los cultivos fueron incubados a 37°C en agitación hasta una D.O<sub>600</sub> de 1.0 y posteriormente fueron usados para determinar la actividad de β-galactosidasa.

#### **4.6. Determinación de la actividad específica de β-galactosidasa (β-gal) y de Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT)**

##### **4.6.1. Determinación de la concentración de proteínas totales**

Las muestras provenientes de los cultivos fueron centrifugadas durante 2 min a 13000 rpm y las pastillas obtenidas fueron resuspendidas en TDTT (Tris-HCl pH 7.8 50 mM; DTT 30 μM). Las

bacterias se lisaron por sonicación con pulsos de 10 seg y otros 10 seg de descanso, durante 6 min. Los restos celulares fueron separados por centrifugación a 13000 rpm durante 15 min y los sobrenadantes conteniendo los extractos totales fueron recuperados en un tubo nuevo.

Las proteínas totales fueron detectadas y cuantificadas mediante un método colorimétrico usando el reactivo de ácido bicinonínico (BCA, Pierce) y sulfato cúprico, en placas de 96 pozos. Primero, 10  $\mu$ l de los extractos fueron depositados en cada pozo, por duplicado. Luego, los reactivos fueron mezclados en una proporción de 50:1, para posteriormente agregar 200  $\mu$ l de esta mezcla a cada uno de los pozos de la placa. Como blanco, 10  $\mu$ l de TDTT fueron depositados en los pozos correspondientes. La placa fue incubada a 37°C por 30 min y se procedió a leer en un lector de microplacas automatizado (CERES) a 562 nm. La concentración de proteína fue calculada interpolando los datos en una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) de 0 a 1.5 mg/ml.

#### **4.6.2. Determinación de la actividad específica de $\beta$ -gal**

Para determinar la actividad de  $\beta$ -gal, en otra placa de 96 pozos fueron depositados 20  $\mu$ l de los extractos en cada pozo, por duplicado. Como blanco, 20  $\mu$ l de TDTT fueron depositados en los pozos correspondientes. Posteriormente, 200  $\mu$ l de 2-Nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) 0.5 mg/ml fueron agregados e inmediatamente se procedió a leer en el CERES, en una reacción cinética a 405 nm. La actividad de las muestras fue determinada interpolando los datos en una curva estándar de 0 a 5400 U. La actividad específica (U/mg) fue obtenida dividiendo el valor de la actividad obtenida en la concentración de proteínas totales.

#### **4.6.3. Determinación de la actividad específica de CAT**

Para determinar la actividad específica de CAT, en una placa de 96 pozos fueron depositados 5  $\mu$ l de los extractos en cada pozo, por duplicado y 200  $\mu$ l de una mezcla de Tris-HCl 1M pH 7.8,



DNTB (5,5'-Ditiobis-2-ácido nitrobenzoico), Acetil-CoA y Cloranfenicol. Inmediatamente se procedió a leer en el CERES, en una reacción cinética a 415 nm. La actividad de las muestras fue determinada interpolando los datos en una curva estándar de 0 a 2500 U. La actividad específica de CAT ( $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ ), fue obtenida dividiendo el valor de la actividad obtenida entre la concentración de proteínas totales.

#### **4.7. Detección de proteínas por Western-blot**

Para detectar las proteínas por Western-blot, 10  $\mu\text{g}$  de extractos totales o de las proteínas purificadas fueron cargadas en geles de SDS-PAGE al 12% y separadas por electroforesis a 35 A por 3 h. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  usando una cámara de transferencia semi-seca (Bio-Rad) a 15 V por 50 min. Las membranas conteniendo las proteínas transferidas fueron bloqueadas con leche reducida en grasa al 5% durante toda la noche en agitación a 4°C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas tres veces con PBST e incubadas con el anticuerpo primario correspondiente para cada caso por 3 h a 4°C en agitación: anticuerpos monoclonales anti-Flag (1:2000), anti-cMyc (1:5000), anti-His<sub>6</sub> (1:1000) o anticuerpos policlonales anti-LexA (1:10000) y anti-GroEL (1:100000) fueron usados. Pasado el tiempo de incubación, las membranas fueron lavadas tres veces con PBST y después fue adicionado el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, anti-ratón (1:10000) o anti-conejo (1:10000), e incubado por 1 h a 4°C en agitación. Posteriormente, las membranas fueron lavadas tres veces con PBST para remover el exceso de anticuerpo no unido y las bandas de las proteínas inmovilizadas en la membrana, fueron reveladas usando el reactivo Western Lightning Chemiluminescence reagent plus (PerkinElmer) y películas azules Kodak X-OMAT, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 4.8. Expresión y purificación de MBP-HilD

La proteína de fusión MBP-HilD (MBP, del inglés “Maltose Binding Protein”) fue expresada en *E. coli* BL21/DE3 conteniendo el plásmido pMAL-HilD1. Las bacterias fueron cultivadas en 1 L de medio LB con ampicilina (200 µg/ml) a 37°C en agitación (200 rpm) hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.6. Posteriormente, la expresión de MBP-HilD fue inducida añadiendo IPTG 1mM al medio de cultivo e incubándolo a 30°C por 4 h en agitación (200 rpm). Pasado el tiempo de incubación, las bacterias fueron recolectadas por centrifugación a 8000 rpm por 8 min a 4°C. Las pastillas fueron lavadas con 50 ml de la solución de columna fría (20mM Tris-HCl pH 7.5, 200mM NaCl, 1mM EDTA y 10mM β-mercaptoetanol) y posteriormente resuspendidas en 30 ml de la misma solución. Las células se lisaron en la prensa de French a 1200 psi. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación a 4°C, a 10000 rpm durante 30 min, y la fracción soluble recuperada en un tubo nuevo.

Para purificar la proteína, se utilizó una columna de polipropileno de 5 mL (Qiagen) conteniendo 2.5 ml de resina de amilosa (New England Biolabs). La columna fue equilibrada con 50 ml de solución de columna y posteriormente la fracción soluble del extracto total fue pasada a través de la columna. Luego, la columna fue lavada cinco veces con 10 ml de la solución de columna, cada uno, seguido de un lavado con 10 ml de solución de columna + 0.1 mM de maltosa, y de otros 5 lavados con 10 ml de solución de columna, cada uno. Finalmente, la proteína fue eluída en 15 ml de solución de elución (solución de columna + 10 mM de maltosa).

Las fracciones recuperadas fueron analizadas por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 12% y posteriormente cargadas en casetes Slide-A-Lyzer 7K (Thermo) y dializadas a 4°C en una solución de diálisis (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 40 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT y 20%

(v/v) glicerol). Luego, la concentración de la proteína dializada fue determinada por el método de Bradford, alícuotada y guardada a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **4.9. Expresión y purificación de Trx-His y Trx-His-HilE**

Las proteínas Trx-His y Trx-His-HilE fueron expresadas en *E. coli* BL21/DE3 conteniendo los plásmidos pET32b(+) y pET32-HilE, respectivamente. Las bacterias fueron cultivadas en 250 ml de LB con ampicilina ( $200\ \mu\text{g/ml}$ ) a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación ( $200\ \text{rpm}$ ) hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600}$  de 0.6. Posteriormente, la expresión de Trx-His o Trx-His-HilE fue inducida añadiendo IPTG  $1\ \text{mM}$  al medio de cultivo e incubándolo a  $30^{\circ}\text{C}$  por 4 h en agitación ( $200\ \text{rpm}$ ). Pasado el tiempo de incubación, las bacterias fueron recolectadas por centrifugación a  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $8000\ \text{rpm}$  por 8 min. Las pastillas fueron lavadas con 50 ml de solución de unión fría ( $5\ \text{mM}$  imidazol,  $500\ \text{mM}$  NaCl,  $20\ \text{mM}$  Tris-HCl pH 8.0) y posteriormente resuspendidas en 30 ml de la misma solución. Las células se lisaron en la prensa de French a 1200 psi. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación a  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $10000\ \text{rpm}$  durante 30 min, y la fracción soluble fue recuperada en un tubo nuevo.

Para purificar las proteínas, se utilizaron columnas de polipropileno de 5 mL (Qiagen) conteniendo 2.0 ml de resina de níquel Ni-NTA (Qiagen). Las columnas fueron equilibradas con 50 ml de solución de unión y posteriormente, la fracción soluble de cada extracto total fue pasada a través de las columnas. Luego, las columnas fueron lavadas 10 veces con 10 ml de la solución de unión, cada uno, seguidos de 10 lavados con 10 ml de la solución de lavado ( $20\ \text{mM}$  imidazol,  $500\ \text{mM}$  NaCl,  $20\ \text{mM}$  Tris-HCl pH 8.0), cada uno. Finalmente, las proteínas fueron eluidas en 10 ml de solución de elución ( $250\ \text{mM}$  imidazol,  $500\ \text{mM}$  NaCl,  $20\ \text{mM}$  Tris-HCl pH 8.0).

Las fracciones recuperadas fueron analizadas por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 12% y posteriormente cargadas en casetes Slide-A-Lyzer 7K (Thermo) y dializadas a 4°C en solución de diálisis (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 40 mM KCl, 1 mM EDTA y 20% (v/v) glicerol). Luego, la concentración de las proteínas dializadas fue determinada por el método de Bradford, alícuotadas y guardadas a -70°C hasta su uso.

#### **4.10. Ensayos de retardo en gel (EMSA, del inglés “Electrophoretic Mobility Shift Assay”) con DNA**

Para realizar los EMSAs, las proteínas purificadas MBP-HilD, Trx-His, Trx-His-HilE, y un fragmento de 50 pb de DNA de *hilC* fueron usados. Este fragmento de DNA fue generado a través del alineamiento de dos oligonucleótidos complementarios HilCRR-F y HilCRR-R. Una mezcla de los oligonucleótidos fue preparada, en un volumen de 200 µl, conteniendo una concentración final de cada oligo de 15 µM. Posteriormente, la mezcla fue calentada a 95°C por 10 min y luego dejada enfriar a temperatura ambiente, durante 15 min. Para los EMSAs competitivos, Las reacciones de unión fueron realizadas en un volumen final de 20 µl, utilizando ~ 100 ng de la mezcla de oligonucleótidos hibridados, una concentración constante de MBP-HilD (0.5 µM) y concentraciones crecientes de Trx-His-HilE o Trx-His (0.3, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 µM) y “buffer” de unión (100 µg/µl BSA, 30 mM HEPES pH 7.7, 5 mM EDTA, 3 mM DTT, 200 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> y 5% glicerol). Para los EMSAs no competitivos, las reacciones de unión fueron realizadas en el mismo volumen final, utilizando el mismo fragmento de DNA de *hilC* y el mismo “buffer” de unión, pero solo fueron agregadas concentraciones crecientes de Trx-His-HilE (0.3, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 µM). Todas las reacciones de unión fueron incubadas a 37°C por 20 min y separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturizante al 6% a temperatura ambiente, usando como “buffer” de corrida Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5x. Los

fragmentos de DNA fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en el transiluminador Alpha-Imager UV (Alpha Innotech Corp.) o en el Molecular Imager® Gel Doc<sup>TM</sup> XR+ (Bio-Rad).

#### **4.11. Ensayo de estabilidad de HilD**

La estabilidad de HilD fue determinada en las cepas mutantes de *S. Typhimurium*  $\Delta hilD$ ,  $\Delta hilD\Delta hilE$  y  $\Delta hilD\Delta lon$ , conteniendo el plásmido pBAD-HilD1. Las bacterias fueron cultivadas en LB a 37°C en agitación (200 rpm) hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.8. La expresión de HilD-Myc a partir del plásmido pBAD-HilD1 fue inducida adicionando 0.05% de L-arabinosa e incubando durante 45 minutos a 37°C en agitación. Posteriormente, fue adicionado un cóctel de antibióticos conteniendo estreptomicina 200 µg/ml, rifampicina 100 µg/ml y cloranfenicol 200 µg/ml, para detener la transcripción y la traducción, así como glucosa al 2% para asegurar la represión de promotor *ara* del plásmido pBAD-HilD1. Los cultivos se siguieron incubando a 37°C en agitación y las muestras fueron tomadas a los 0, 10, 20, 30, 60 y 180 min posteriores a la adición del cóctel de antibióticos. La expresión de la proteína HilD-Myc fue detectada por Western blot en los diferentes tiempos. Como control de carga la expresión de GroEL fue detectada. La intensidad de las bandas obtenidas por Western blot, fueron cuantificadas por densitometría usando el programa Image J, versión 1.47v (National Institutes of Health, USA). Los valores de las bandas de HilD-Myc fueron normalizados con respecto a los valores de GroEL e indicados como el porcentaje relativo de HilD-Myc con respecto al tiempo “0”. La vida media de HilD ( $t_{1/2}$ ) fue calculada con la ecuación de decaimiento exponencial.

#### **4.12. Análisis de proteínas secretadas**

Las cepas de *S. Typhimurium* fueron cultivadas en medio LB a 37°C durante 9 h en agitación (200 rpm). Muestras de 1.5 ml de cada uno de los cultivos fueron tomadas y centrifugadas a 14000 rpm por 5 min. El sobrenadante conteniendo las proteínas secretadas fue recuperado en un tubo nuevo (aproximadamente 1.3 ml) y posteriormente fue adicionado ácido tricloroacético 15% (v/v) para precipitar las proteínas, e incubado toda la noche a 4°C. Al siguiente día, las proteínas precipitadas se recuperaron por centrifugación a 14000 rpm durante 30 min. Las pastillas fueron resuspendidas con 25 µl de “buffer” de carga de SDS-PAGE y las proteínas separadas por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 12% a 35 A por 3 h. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250.

#### **4.13. Cromatografía de exclusión molecular**

La proteína MBP-HilD fue analizada por cromatografía de exclusión molecular, a través del sistema AKTA-FPLC (del inglés, “fast protein liquid chromatography”). La columna utilizada fue Superdex 200 HiLoad™ 26/60 (GE Healthcare Life Sciences). El procedimiento fue realizado en una solución conteniendo 200 mM Tris-HCl pH 8.0 y 150 mM NaCl, con un flujo de 0.5 ml/min, 0.3 MPa de presión, a 20°C. La columna fue calibrada previamente con marcadores de pesos molecular para filtración en gel (Sigma-Aldrich), los cuales incluyen citocromo C de corazón de caballo (12.4 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), alcohol deshidrogenasa de levadura (150 kDa) y amilasa de camote (200 kDa). El peso molecular relativo de MBP-HilD fue determinado por interpolación del valor obtenido en la curva de calibración.

#### **4.14. Ensayos de “pull-down”**

Para este ensayo fueron utilizadas las proteínas purificadas Trx-His-HilE, Trx-His y extractos totales conteniendo las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-130</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub> o LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub>. Primero, las proteínas cebo, Trx-His-HilE o Trx-His fueron inmovilizadas sobre una resina de níquel. Para esto, en un tubo de 1.5 ml fueron agregados 80 µl de resina Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibrada con solución de lisis (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 8.0) y 15 µg de proteínas purificadas Trx-His-HilE o Trx-His. La mezcla fue incubada a 10°C por 1 h en agitación (800 rpm). Luego, la resina fue lavada para eliminar el exceso de proteína cebo no unida, con 1 ml de solución de lavado (70 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl y 35 mM imidazol, pH 8.0), y cetrifugada a 6500 rpm por 1 min. El sobrenadante fue restirado y posteriormente, 80 µl de los extractos totales conteniendo las proteínas presas correspondientes fueron agregados a la resina lavada previamente. Los tubos fueron incubados nuevamente a 10°C por 1 h en agitación (800 rpm). Para remover el exceso de proteínas no unidas, la resina fue lavada 5 veces con solución de lavado, centrifugando a 6500 rpm por 1 min, entre cada lavado. Finalmente, la resina con las proteínas unidas fue resuspendida en 20 µl de “buffer” de carga de SDS-PAGE con 1.5% de β-mercaptoetanol. Las muestras fueron calentadas a 99°C por 5 min y las proteínas separadas en un gel de SDS-PAGE al 12%, las cuales fueron analizadas posteriormente por Western blot.

#### **4.15. Alineamiento de secuencia y predicción de estructura terciaria de HilE y HilD y predicción de la estructura cuaternaria de HilE**

Las secuencias de HilE y varias proteínas Hcp fueron alineadas utilizando el servidor Clustal Omega. La predicción de la estructura terciaria de HilE y HilD fue realizada mediante el uso del servidor I-TASSER de modelado estructural. La predicción de la estructura cuaternaria de HilE

fue hecha por superposición de cada monómero de HilE sobre la estructura cristalográfica del hexámero de *Acinetobacter baumannii* PDB 4W64 (Ruiz et al., 2015). Todos los gráficos fueron realizados en PyMOL versión 1.8 (PyMOL Molecular Graphics System, version 1.8).

#### **4.16. Construcción del modelo del dímero de HilD y de interacción de HilD con HilE y mutagénesis *in silico* por alanina**

Para construir los modelos del dímero de HilD y de interacción de HilD con HilE fue utilizado el servidor ClusPro (Comeau et al., 2004). La mutagénesis *in silico* por alanina fue realizada mediante el uso del servidor Robetta (Kim et al., 2004).

#### **4.17. Construcción de la cepa mutante $\Delta hilD_{130-309}::kan$**

Para generar la cepa  $\Delta hilD_{130-309}::kan$  que expresa la proteína HilD<sub>130-309</sub> a partir de su propio promotor en el cromosoma, fue utilizado un método descrito previamente basado en la recombinasa  $\lambda$ red y el plásmido p2795-HilD130 (Datsenko and Wanner, 2000; Gerlach et al., 2007; Husseiny and Hensel, 2005). Usando el DNA del plásmido p2795-HilD130 como molde, se realizó un PCR con los oligonucleótidos R-FW y R-RV para amplificar la secuencia del gen que codifica la proteína HilD<sub>130-309</sub> y el gen de resistencia a kanamicina. El producto obtenido, fue precipitado y transformado en la cepa mutante  $\Delta hilD$  de *S. Typhimurium* SL1344 conteniendo el plásmido pKD46 que codifica la recombinasa  $\lambda$ red. Las bacterias transformantes fueron cultivadas en LB con kanamicina a 42°C durante toda la noche. Posteriormente, algunas colonias fueron seleccionadas y cultivadas nuevamente en LB con kanamicina e incubadas a 42°C. Luego, las colonias que crecieron en este medio, fueron cultivadas en LB con ampicilina e incubadas a 37°C por toda la noche. Aquéllas colonias que fueron resistentes a kanamicina pero sensibles a ampicilina, fueron seleccionadas como candidatas de la recombinación y checadas por



secuenciación y PCR con las siguientes combinaciones de oligonucleótidos HilD228/K2, HilD228/HilD160, HilD228/HilD220.

#### **4.18. Análisis estadísticos**

Los datos de actividad específica de CAT y  $\beta$ -gal fueron analizados usando el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. El valor de  $p < 0.05$  fue considerado como significativo. Todos los análisis se realizaron con el programa Prism 6, versión 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

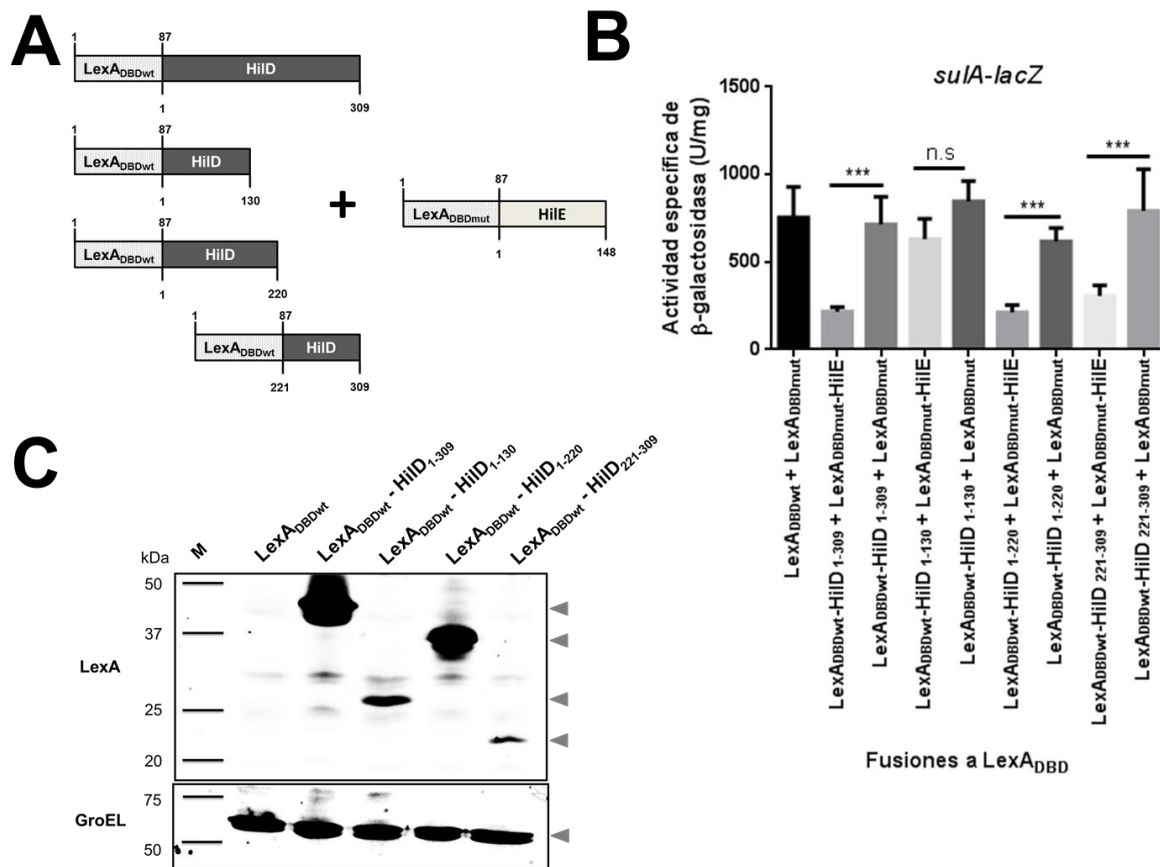
## 5. Resultados

### 5.1. Hile interacciona con la región central de HilD

Para estudiar más a fondo la interacción de Hile con HilD, usamos el sistema de interacción proteína-proteína basado en LexA; que fue el mismo sistema que se usó cuando se identificó inicialmente la interacción entre HilD y Hile (Baxter et al., 2003). El sistema para la heterodimerización consta de dos plásmidos, pSR658 y pSR659, los cuales expresan un LexA<sub>DBD</sub> WT (LexA<sub>DBDwt</sub>) y un LexA<sub>DBD</sub> mutado (LexA<sub>DBDmut</sub>), respectivamente, así como de la cepa reportera *E. coli* SU202 que contiene en su genoma la fusión *sulA-lacZ* con un sitio de unión de LexA híbrido, una mitad WT y la otra mutada (Daines and Silver, 2000; Dmitrova et al., 1998), de tal manera que sólo un heterodímero LexA<sub>DBDwt</sub>-LexA<sub>DBDmut</sub> puede unirse al sitio híbrido y así reprimir la expresión de la fusión *sulA-lacZ* en esta cepa reportera.

Se clonó al gen de *hilD* en el plásmido pSR658 y a *hile* en el pSR659, en fase con la secuencia que codifica para el LexA<sub>DBDwt</sub> y LexA<sub>DBDmut</sub> respectivamente, obteniéndose los plásmidos que expresan las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD y LexA<sub>DBDmut</sub>-Hile. Se confirmó que HilD interacciona con Hile, evidenciado por la represión de *sulA* en presencia de LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD y LexA<sub>DBDmut</sub>-Hile (figura 5B). Para comenzar a delimitar la región de HilD que interacciona con Hile, se clonaron diferentes segmentos de *hilD* en el plásmido pSR658 en fase con LexA<sub>DBDwt</sub> y se obtuvieron los plásmidos que expresan las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-130</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub> (figura 5A). Se transformaron en la cepa reportera *E. coli* SU202, junto con el plásmido que expresa a la proteína LexA<sub>DBDmut</sub>-Hile. La expresión de la fusión *sulA-lacZ* disminuyó en presencia de las proteínas de fusión LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>-Hile, y

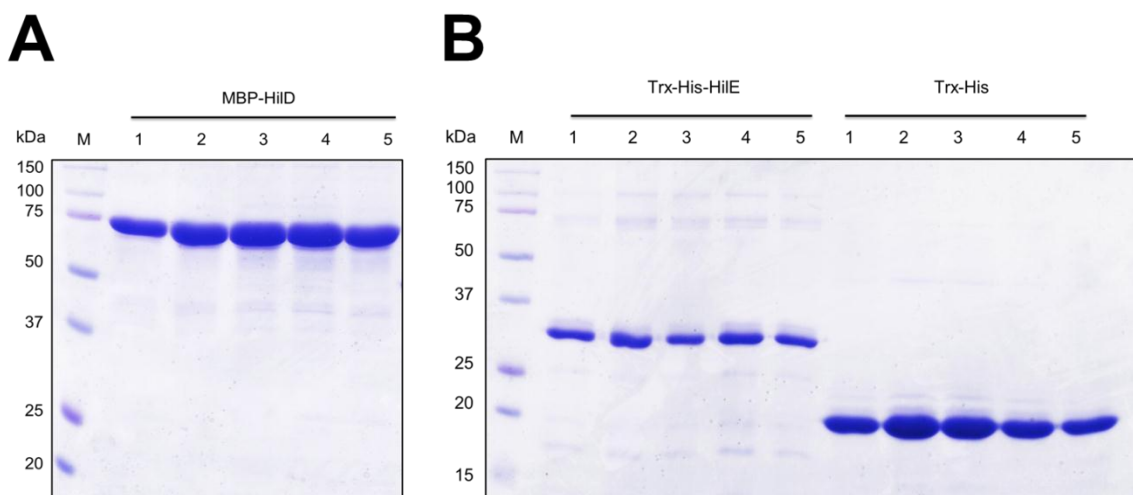
LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>-HilE y no en presencia de LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-130</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>-HilE, así como sus respectivos controles negativos LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-130</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>, indicando que HilE interacciona con HilD, de manera independiente con dos regiones comprendidas entre los aminoácidos 130 al 220 y 221 al 309 (figura 5B). Asimismo, la expresión de las proteínas fusionadas a LexA<sub>DBDwt</sub> fue confirmada por Western blot (figura 5C); sin embargo, no se pudo detectar la expresión de LexA<sub>DBDwt</sub>, lo cual ya ha sido reportado anteriormente por otros autores quienes atribuyen que la ausencia de detección se debe a inestabilidad de esta proteína (Poore et al., 2001). En conjunto, estos resultados indican que HilE interacciona con la región central de HilD, entre los aminoácidos 130 a 220, y con el dominio de unión a DNA, comprendido entre los aminoácidos 221 a 309.



**Figura 5. HilE interacciona con la región central de HilD.** (A) Representación de las proteínas de fusión LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-130</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub>. (B) La expresión de la fusión *sulA-lacZ* se determinó en *E.coli* SU202 conteniendo los plásmidos pSR658 y pSR659 (LexA<sub>DBDwt</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>), pSR658-HilD1 y pSR659-HilE1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>-HilE), pSR658-HilD1 y pSR659 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>), pSR658-HilD2 y pSR659-HilE1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-130</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>-HilE), pSR658-HilD2 y pSR659 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-130</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>), pSR658-HilD4 y pSR659-HilE1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>-HilE), pSR658-HilD4 y pSR659 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>), pSR658-HilD5 y pSR659-HilE1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>-HilE), o los plásmidos pSR658-HilD5 y pSR659 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>-HilE). La actividad de β-galactosidasa se determinó en cultivos crecidos en LB e incubados a 37°C hasta una DO<sub>600</sub> de 1.0. La expresión de LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-130</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub>, LexA<sub>DBDmut</sub> y LexA<sub>DBDmut</sub>-HilE fue inducida adicionando 1 mM de IPTG al medio de cultivo. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. \*\*\* datos estadísticamente significativos comparados con el alcanzado en ausencia de LexA<sub>DBDmut</sub>-HilE ( $p < 0,001$ ). (C) Western blot para analizar la expresión de las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-130</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub>. Extractos de proteína total fueron analizados con anticuerpos policlonales Anti-LexA o Anti-GroEL. Las muestras fueron obtenidas de los cultivos crecidos en LB con 1mM de IPTG e incubados a 37°C hasta una DO<sub>600</sub> de 1.0. M, marcador de peso molecular. Las cabezas de flecha indican las bandas esperadas.

Para confirmar la interacción de HilD con HilE por otro método, se realizaron ensayos de “pull-down”. Para esto se expresó y purificó la proteína HilD fusionada por la región N-terminal a la

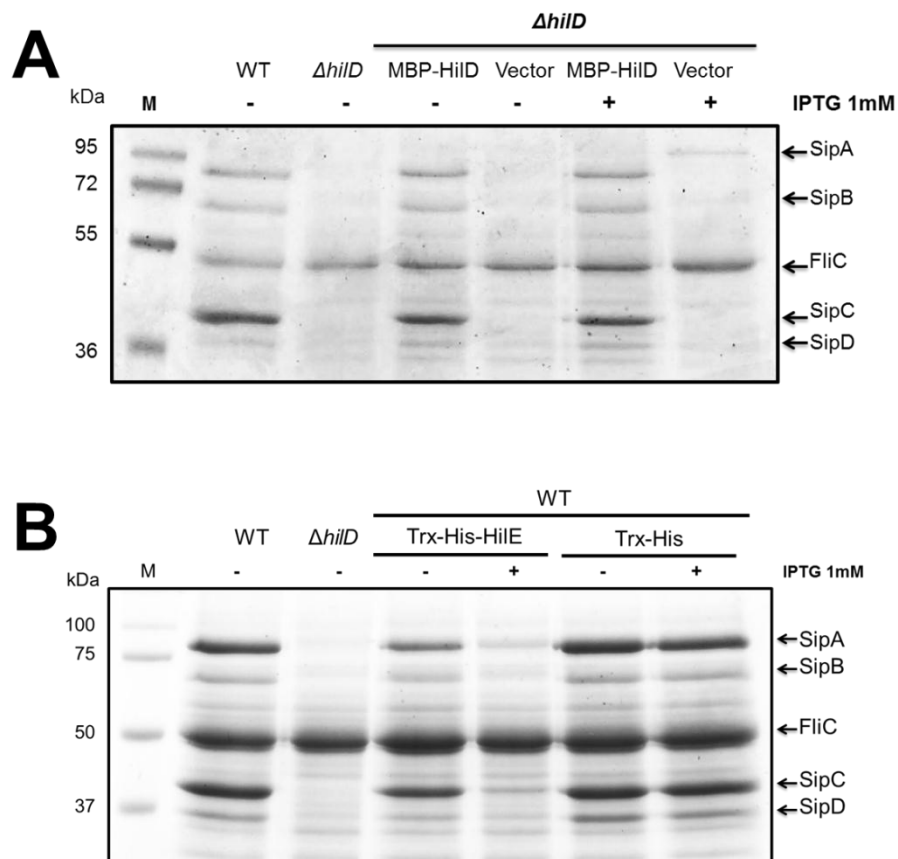
proteína de unión a maltosa (MBP-HilD), la proteína HilE fusionada por la región N-terminal a Tiorredoxina (Trx-His-HilE) y la proteína Tiorredoxina (Trx-His), tal y como se describe en la sección de métodos. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad utilizando resina de amilosa para MBP-HilD o de níquel para Trx-His-HilE y Trx-His, respectivamente. Las diferentes fracciones recuperadas, se cargaron en geles de SDS-PAGE al 12% para comprobar la pureza de las proteínas (figura 6), las cuales posteriormente fueron dializadas, cuantificadas y guardadas hasta su uso. La proteína de fusión MBP-HilD tiene un tamaño aproximado de 78 kDa (figura 6A), mientras que Trx-His tiene un tamaño de 17 kDa y la proteína de fusión Trx-His-HilE de 33 kDa (figura 6B).



**Figura 6. Purificación de proteínas MBP-HilD, Trx-His-HilE y Trx-His.** (A) MBP-HilD purificada por cromatografía de afinidad con resina de amilosa. (B) Trx-His-HilE y Trx-His purificadas por cromatografía de afinidad con resina de níquel. Los números representan las fracciones obtenidas. M, marcador de peso molecular.

Asimismo, se comprobó la funcionalidad de las proteínas expresadas a partir de estos plásmidos, mediante análisis de perfiles de proteínas secretadas. Dentro de los genes de SPI-1, se encuentran aquellos que codifican las proteínas efectoras SipA, SipB, SipC y SipD, las cuales pueden detectarse en sobrenadantes de cultivos de *S. Typhimurium* crecidos en LB y visualizarse en un

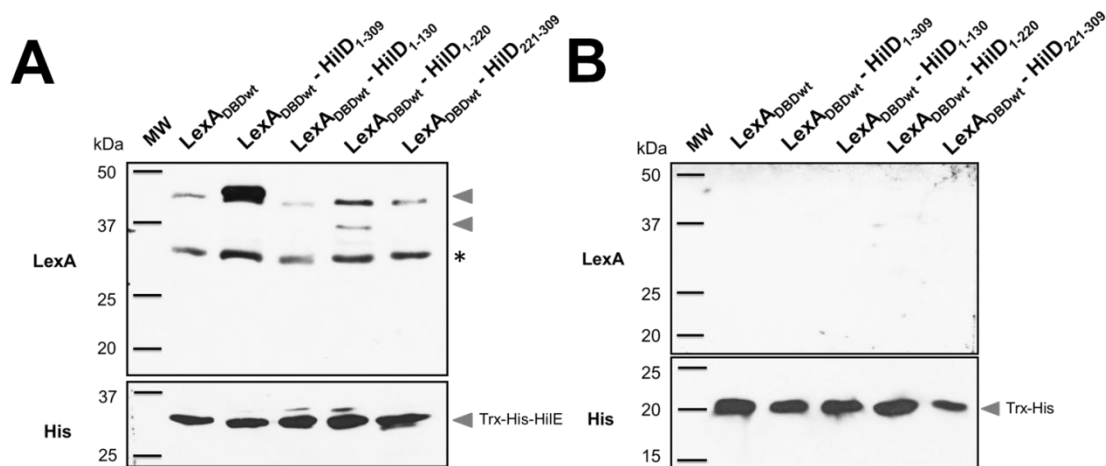
gel SDS-PAGE. Si MBP-HilD expresada a partir del plásmido pMAL-HilD1 es funcional, se espera que restaure la expresión y secreción de proteínas en una cepa de *S. Typhimurium*  $\Delta hilD$ ; por otro lado si Trx-His-HilE expresada a partir del plásmido es funcional, se espera que reprima la expresión de los genes de SPI-1, incluyendo aquellos que codifican para las proteínas efectoras secretadas al medio de cultivo en una cepa de WT de *S. Typhimurium*. MBP-HilD restauró la secreción de proteínas en una cepa de *S. Typhimurium*  $\Delta hilD$  (figura 7A). De la misma manera, Trx-His-HilE reprimió la expresión de los genes de SPI-1 y por consiguiente la secreción de las proteínas al medio de cultivo, en una cepa WT de *S. Typhimurium* (figura 7B). Estos resultados indican que ambas proteínas, MBP-HilD y Trx-His-HilE, son funcionales.



**Figura 7.** Perfil de proteínas secretadas de la cepa mutante  $\Delta hilD$  y WT de *S. Typhimurium* conteniendo los plásmidos que expresan las proteínas MBP-HilD y Trx-His-HilE, respectivamente. La secreción de proteínas

SipA, SipB, SipC, y SipD codificadas en SPI-1 fue determinada en *S. Typhimurium* WT y en su derivada mutante  $\Delta hilD$ , así como en (A) la mutante  $\Delta hilD$  conteniendo el plásmido pMAL-HilD1 que expresa la proteína MBP-HilD o el vector pMAL-c2x y en (B) *S. Typhimurium* WT conteniendo el plásmido pET32-HilE que expresa a HilE o el vector pET32b(+), en presencia (+) o ausencia (-) de IPTG. Los cultivos bacterianos fueron crecidos en LB a 37°C por 9 h y los sobrenadantes fueron analizados en geles de SDS-PAGE AL 12%. FliC es una proteína flagelar cuya secreción es independiente de SPI-1. M, marcador de peso molecular.

Teniendo las proteínas purificadas, se realizó el ensayo de “pull-down”. Primero se inmovilizó a Trx-His-HilE en la resina de níquel Ni-NTA (Qiagen); posteriormente, extractos totales que contenían las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-130</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub> o LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub> se pusieron a interactuar con la resina que tenía a Trx-His-HilE inmovilizada. Como control negativo, los extractos totales que contenían las diferentes versiones de LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD se pusieron a interactuar con tiorredoxina (Trx-His). Trx-His-HilE capturó a las proteínas LexA<sub>DBD</sub>-HilD<sub>1-309</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub>, indicando que HilD interacciona por la región central (aminoácidos 130 a 220) con HilE (figura 8A). Sin embargo, la interacción de LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub> con HilE evidenciada por el sistema de dos híbridos, no pudo confirmarse con el ensayo de pull-down, lo que podría explicarse debido al bajo nivel de expresión de LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub>. En contraste, ninguna proteína fue capturada por Trx-His (figura 8B), confirmando que la interacción de HilD es específica con HilE y no con la proteína de fusión Trx.

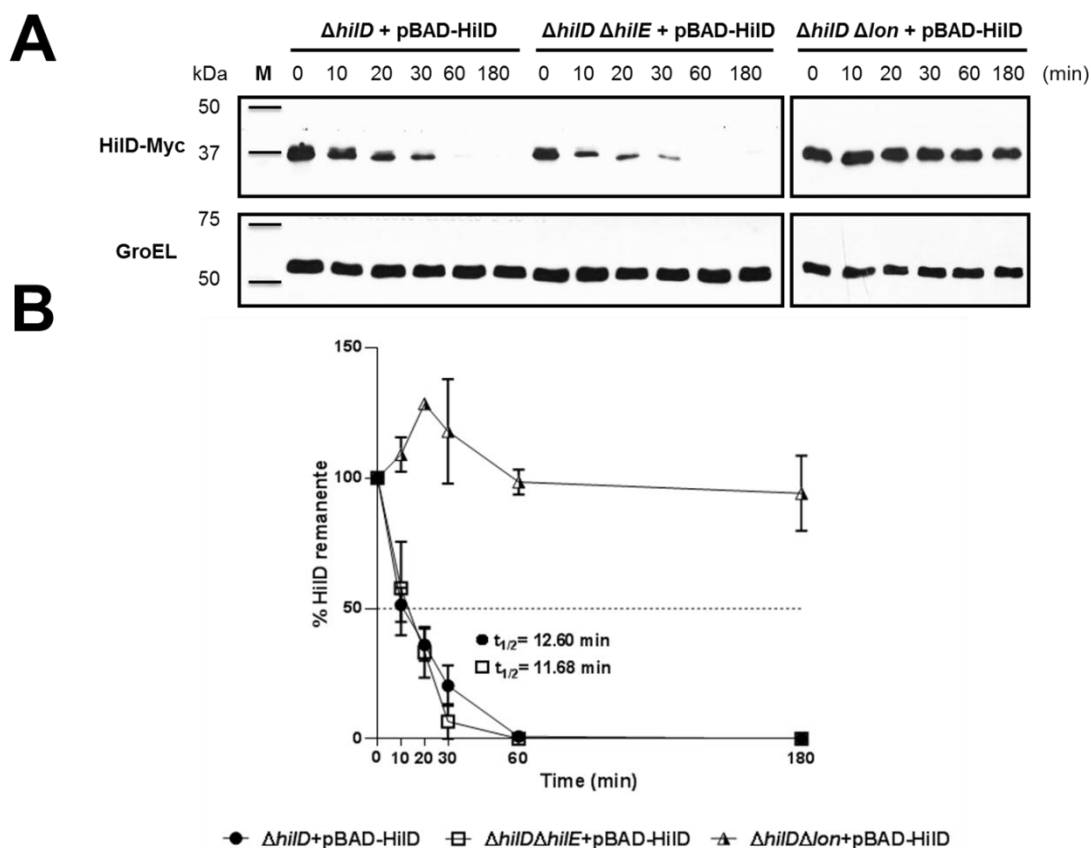


**Figura 8. Ensayo de “pull-down” que muestra la interacción de HilD con HilE.** Las proteínas Trx-His-HilE (A) o Trx-His (B) fueron inmovilizadas en la resina de níquel Ni-NTA e incubadas con extractos totales que contenían las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-130</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub> o LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub>. Después de lavar, las proteínas capturadas por Trx-His-HilE o Trx-His, fueron analizadas por Western-blot usando anticuerpos policlonales anti-LexA. Las proteínas Trx-His-HilE y Trx-His también fueron detectadas con anticuerpos monoclonales anti-His<sub>6</sub>. M, marcador de peso molecular; las cabezas de flecha indican las bandas esperadas; el asterisco indica bandas inespecíficas.

## 5.2. HilE no afecta la estabilidad de HilD

Existen varios mecanismos a través de los cuales HilE podría afectar la actividad de HilD, uno de ellos es mediante la disminución de la estabilidad de HilD, promoviendo así su degradación e interfiriendo de esta manera con su función. Para definir esto, se determinó la vida media *in vivo* de HilD en presencia o ausencia de HilE o la proteasa Lon, la cual degrada HilD. Los niveles de HilD-Myc, expresados bajo un promotor inducible por arabinosa a partir del plásmido pBAD-HilD1, en medio rico LB, fueron monitoreados en las respectivas mutantes,  $\Delta hilD$ ,  $\Delta hilD \Delta hilE$  y  $\Delta hilD \Delta lon$ , posterior a la adición del cóctel de antibióticos para inhibir la transcripción y la traducción (estreptomina 200µg/mL, cloranfenicol 200µg/mL y rifampicina 100µg/mL). La estabilidad de HilD-Myc en LB no fue afectada significativamente por la ausencia de HilE, siendo su vida media ( $t_{1/2}$ ) en la cepa  $\Delta hilD$  igual a 12.60 minutos, mientras que su  $t_{1/2}$  en la cepa  $\Delta hilD \Delta hilE$  fue 11.68 minutos. Por otro lado, y como era de esperarse, en la cepa  $\Delta hilD \Delta lon$  la estabilidad de HilD-Myc se aumentó drásticamente (figura 9). Estos resultados indican que la interacción con HilE no afecta la estabilidad de HilD.





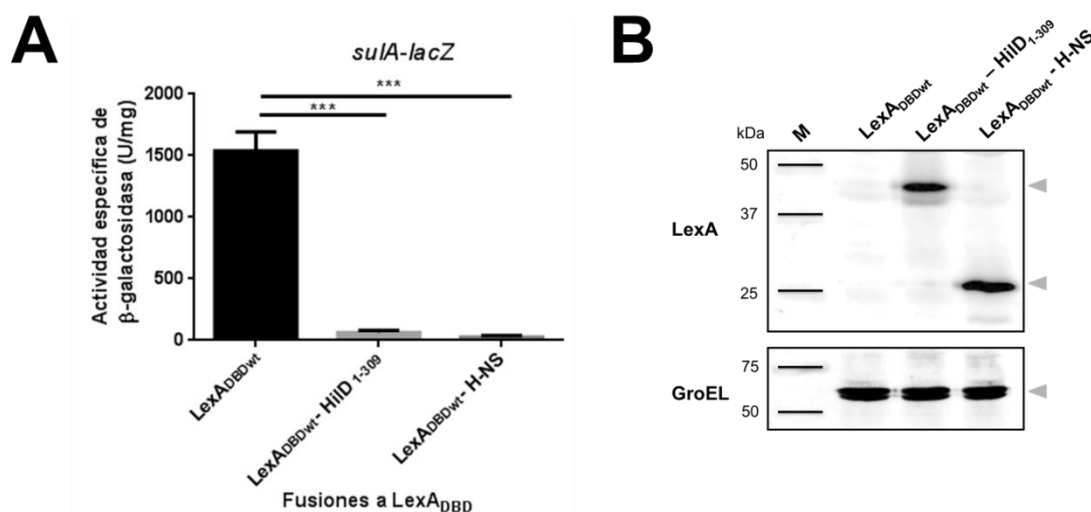
**Figura 9. HilE no afecta la estabilidad de HilD.** (A) La estabilidad de HilD-Myc fue determinada en cepas mutantes de *S. Typhimurium* *ΔhilD*, *ΔhilD Δhile* y *ΔhilD Δlon* conteniendo el plásmido pBAD-HilD1, crecidas en medio LB a 37°C. La expresión de HilD-Myc a partir del plásmido pBAD-HilD1 fue inducida con L-arabinosa al 0.05% por 45 minutos. Posterior a eso se adicionó un cóctel de antibióticos (estreptomycin 200μg/mL, cloranfenicol 200μg/mL y rifampicina 100μg/mL) más glucosa 2% para inhibir la transcripción y la traducción y se tomaron muestras de los cultivos en los tiempos indicados. La expresión de HilD-Myc fue determinada por Western-blot, usando el anticuerpo monoclonal anti-cMyc y 10μg de extracto total de proteínas. Como control de carga, la expresión de GroEL también fue determinada usando el anticuerpo policlonal anti-GroEL. Se muestra un Western-blot representativo de tres ensayos independientes. (B) Análisis densitométricos de las bandas de HilD-Myc obtenidas en los Western-blot indican el porcentaje relativo de HilD con respecto al tiempo cero. Los valores de intensidad de las bandas de HilD-Myc fueron normalizados con los valores de intensidad de GroEL. Los valores representan el promedio de tres ensayos independientes. Las barras representan las desviaciones estándar y  $t_{1/2}$  la vida media de HilD-Myc. M, marcador de peso molecular (Precision Plus Protein<sup>TM</sup>; Bio-Rad).

### **5.3. HilD actúa como dímero y su dominio de dimerización se encuentra en la región central**

Nuestros resultados demuestran que HilE interacciona con la región central de HilD. Hasta el momento se desconoce si esta región contiene alguna función importante para HilD, como un dominio de dimerización o sitios de reconocimiento de señales. Previos estudios han mostrado que algunas proteínas pertenecientes a la familia AraC dimerizan y que los dominios de dimerización están contenidos en la región N-terminal (Brutinel et al., 2009; Bustos and Schleif, 1993; Poore et al., 2001; Prouty et al., 2005). Para determinar si HilD también forma dímeros se usó el sistema genético de interacción proteína-proteína basado en LexA, pero con la modificación para homodimerización. Este consta de un plásmido, pSR658, que expresa LexA<sub>DBDwt</sub>, así como de la cepa reportera *E. coli* SU101 que contiene en su genoma la fusión *sulA-lacZ* con un sitio de unión de LexA silvestre (Daines and Silver, 2000; Dmitrova et al., 1998), de tal manera que sólo un homodímero LexA<sub>DBDwt</sub>-LexA<sub>DBDwt</sub> puede unirse al sitio de unión de LexA silvestre y así reprimir la expresión de la fusión *sulA-lacZ* en esta cepa reportera.

Se transformó el plásmido pSR658-HilD1 que expresa a la proteína LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> en la cepa reportera *E. coli* SU101, la cual contiene en su cromosoma una fusión transcripcional del gen *sulA* al gen reportero *lacZ* (Daines and Silver, 2000). El gen *sulA* se reprime por LexA; por lo tanto, si HilD dimerizara, la presencia del plásmido pSR658-HilD1 reprimiría la expresión de la fusión *sulA-lacZ* en esta cepa. Como controles se analizaron transformantes con el vector que expresa a LexA<sub>DBDwt</sub> (control negativo) y con el plásmido que expresa la proteína de fusión LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS, cuya capacidad de dimerizar ya ha sido probada por este sistema (Ibarra et al., 2003; Martinez et al., 2014b). La expresión de la fusión *sulA-lacZ* disminuyó drásticamente en presencia de las proteínas de fusión LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS (figura 10A), lo cual

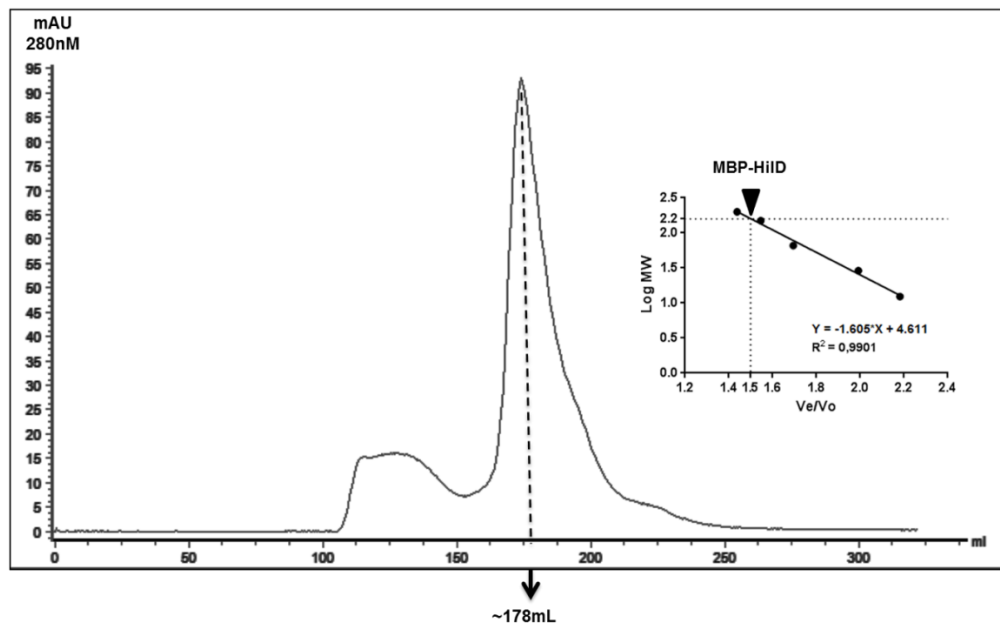
indica que HilD contiene un dominio de dimerización que permite restaurar la capacidad de LexA de reprimir la expresión de *sulA*. Asimismo, la expresión de estas proteínas fue confirmada por Western blot (figura 10B).



**Figura 10. HilD forma homodímeros.** (A) La expresión de la fusión *sulA-lacZ* se determinó en *E.coli* SU101 conteniendo el vector pSR658 (LexA<sub>DBDwt</sub>), o los plásmidos pSR658-HilD1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>) o pSR658-HNS (LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS). La actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa se determinó en cultivos crecidos en LB incubados a 37°C hasta una DO<sub>600</sub> de 1.0. La expresión de LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS fue inducida adicionando 1 mM de IPTG al medio de cultivo. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras indican la desviación estándar, \*\*\* datos estadísticamente significativos comparados con el valor alcanzado en LexA<sub>DBDwt</sub> ( $p < 0,001$ ). (B) Western blot para analizar la expresión de las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD y LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS. Extractos de proteína total provenientes de *E. coli* SU101 conteniendo el vector pSR658, el plásmido pSR658-HilD1 o pSR658-HNS fueron analizados con anticuerpos policlonales Anti-LexA o Anti-GroEL. Las muestras fueron obtenidas de los cultivos crecidos en LB con 1mM de IPTG e incubados a 37°C hasta una DO<sub>600</sub> de 1.0.

Adicionalmente, se analizó el tamaño de la proteína MBP-HilD mediante experimentos de cromatografía de exclusión molecular. La proteína de fusión MBP-HilD tiene un tamaño aproximado de 78 kDa. Al analizar el volumen de elución en el que fue recuperada MBP-HilD posterior a la exclusión, y compararlo contra una curva de calibración realizada previamente, se observó que el tamaño correspondía a un producto de aproximadamente de 178 kDa (figura 11),

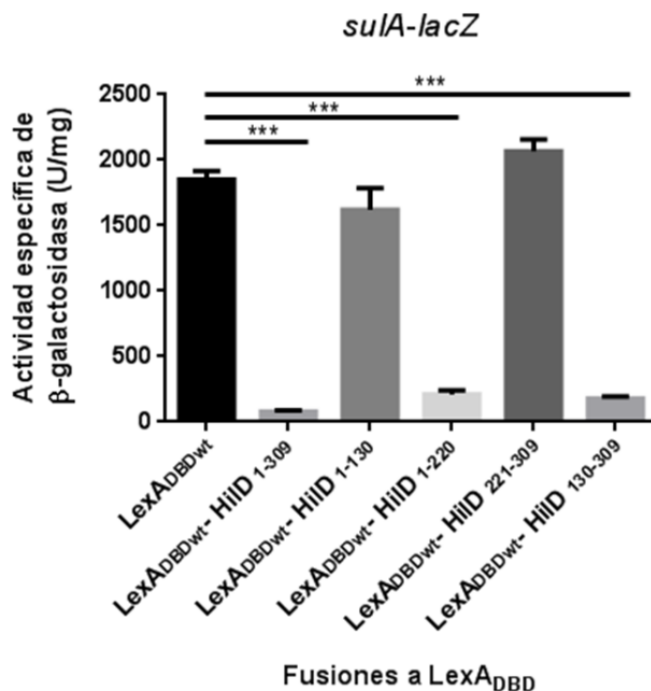
que se aproxima al tamaño teórico esperado de un dímero de MBP-HilD (~156 kDa). En conjunto, estos resultados demuestran que HilD dimeriza.



**Figura 11. Cromatografía de exclusión molecular de MBP-HilD.** Cromatograma que muestra el perfil de elución de la proteína de fusión MBP-HilD, analizada en la columna Superdex 200 column (HiLoad™ 16/60) en una solución que contiene 200 mM Tris-HCl pH 8.0 y 150 mM NaCl. A la derecha se muestra la curva de calibración obtenida usando el kit “Gel Filtration Molecular Weight Markers Kit (Sigma-Aldrich)”. Las flechas indican el peso molecular relativo de MBP-HilD calculado por interpolación de los datos en la curva de calibración.

Para delimitar la región que contiene el dominio de dimerización de HilD, se usaron los diferentes segmentos de *hilD* clonados anteriormente en el plásmido pSR658, en fase con el LexA<sub>DBD</sub>wt (figura 5A). La presencia del plásmido que expresa la proteína LexA<sub>DBD</sub>-HilD<sub>1-220</sub> reprimió la expresión de la fusión *sulA-lacZ*, indicando que dimeriza (figura 12). En contraste, las proteínas LexA<sub>DBD</sub>-HilD<sub>1-130</sub> y LexA<sub>DBD</sub>-HilD<sub>221-309</sub> no reprimieron la expresión de la fusión *sulA-lacZ* (figura 12). Esto indica que el dominio de dimerización se encuentra entre los aminoácidos 130 al 220. Para corroborar este resultado, se clonó un segmento de HilD que contenía los aminoácidos 130 a 309 en fase con LexA<sub>DBD</sub>wt y se transformó en la cepa reportera de *E. coli* SU101. Como era esperado, la proteína de fusión LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>130-309</sub> reprimió la

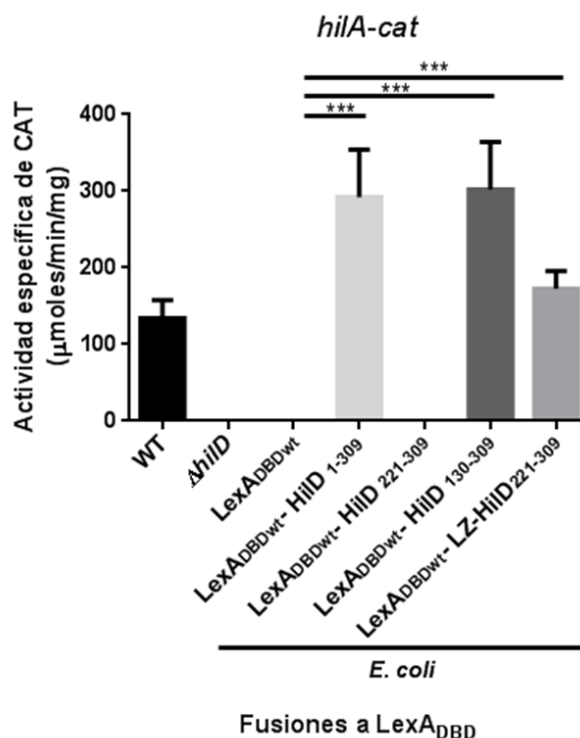
expresión de la fusión *sulA-lacZ* (figura 12). En conjunto, nuestros resultados sugieren que similar a otros miembros de la familia AraC, HilD contiene un dominio de dimerización (Bustos and Schleif, 1993; Childers et al., 2011; Prouty et al., 2005), el cual está localizado en la región central comprendida entre los aminoácidos 130 al 220. De manera interesante esta es la misma región que interacciona con HilE.



**Figura 12. HilD forma homodímeros a través de su región central.** La expresión de la fusión *sulA-lacZ* se determinó en *E. coli* SU101 transformada con los plásmidos pSR658 (LexA<sub>DBD</sub>wt), pSR658-HilD1 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-309</sub>), pSR658-HilD2 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-130</sub>), pSR658-HilD4 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-220</sub>), pSR658-HilD5 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>221-309</sub>) o pSR658-HilD3 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>130-309</sub>). La actividad de β-galactosidasa se determinó en cultivos crecidos en LB e incubados a 37°C hasta una DO<sub>600</sub> de 1.0. La expresión de LexA<sub>DBD</sub>wt, LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-130</sub>, LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-220</sub>, LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>221-309</sub> y LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>130-309</sub> fue inducida adicionando 1 mM de IPTG al medio de cultivo. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. \*\*\* datos estadísticamente significativos comparados con el valor alcanzado en LexA<sub>DBD</sub>wt ( $p < 0,001$ ).

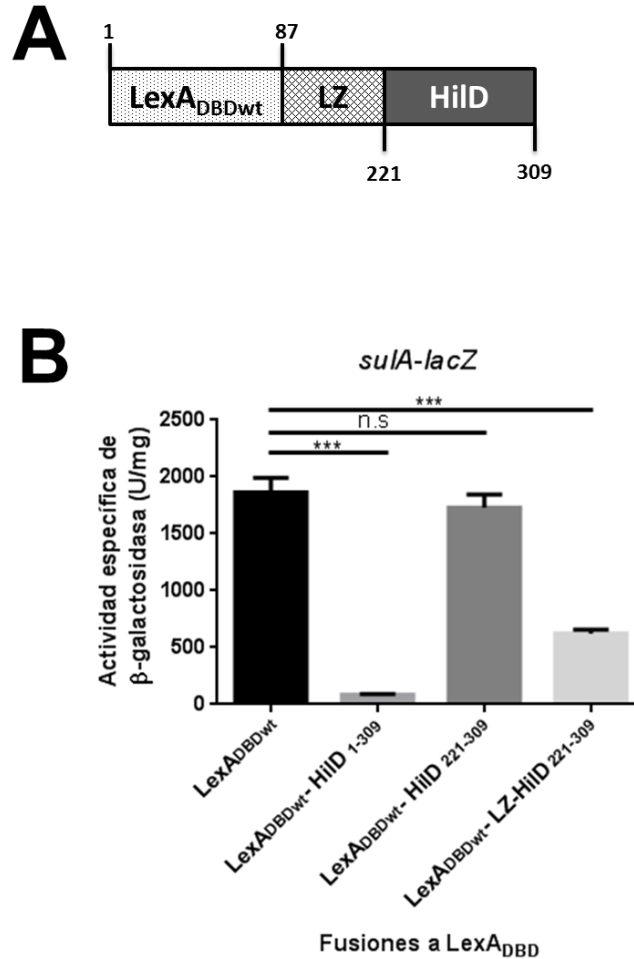
#### 5.4. La dimerización de HilD es importante para la función

Para determinar si la dimerización es importante para la función de HilD evaluamos si la proteína LexA<sub>DBD</sub>-HilD<sub>221-309</sub>, la cual ya no es capaz de dimerizar (figura 12) pero contiene los elementos necesarios para unir al DNA, induce la expresión de *hila*. Para esto se empleó la cepa de *E. coli* MC4100 que contiene la fusión transcripcional *hila-cat*, la cual se transformó con el plásmido que expresa a la proteína LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub>. Como control se transformó a *E. coli* con el plásmido que expresa la proteína LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> o con el vector que expresa a LexA<sub>DBDwt</sub>. También se midió la actividad de *hila-cat* en una cepa de *S. Typhimurium* WT y en su derivada mutante  $\Delta$ *hilD*. LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> induce la expresión de *hila-cat*; en contraste, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub>, la cual no dimeriza, no induce la expresión de *hila-cat* (figura 13). Posteriormente, se fusionó un motivo de leucina “zipper” (LZ) de la proteína GCN4 de *Saccharomyces cerevisiae* a la porción de HilD<sub>221-309</sub>. Este motivo ha sido caracterizado como dominio de dimerización y usado para la construcción de proteínas quiméricas (Bustos and Schleif, 1993; Karimova et al., 2000), que al ser fusionadas recuperan la capacidad de dimerizar y función (Karimova et al., 1998). Se amplificó la porción de HilD<sub>221-309</sub> a partir de DNA cromosómico de *S. Typhimurium* SL1344 y mediante PCR se obtuvo el producto LZ-HilD<sub>221-309</sub>, el cual se clonó en el plásmido pSR658, con lo que se obtuvo el plásmido pSR658-HilD6 que expresa la proteína LexA<sub>DBD</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> (figura 14A).



**Figura 13. LexA<sub>DBD</sub>-HilD<sub>221-309</sub> no induce la expresión de *hilA*.** La expresión de la fusión *hilA-cat*, contenida en el plásmido *phlA-cat1*, se determinó en *S. Typhimurium* WT y en su derivada mutante *ΔhilD*, así como en *E. coli* MC4100 conteniendo el vector pSR658 (LexA<sub>DBD</sub>wt) o los plásmidos pSR658-HilD1 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-309</sub>), pSR658-HilD5 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>221-309</sub>) o pSR658-HilD6 (LexA<sub>DBD</sub>wt-LZ-HilD<sub>221-309</sub>). La actividad específica de CAT se determinó en cultivos crecidos en LB e incubados a 37°C. La expresión de LexA<sub>DBD</sub>wt, LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>221-309</sub>, LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>130-309</sub> y LexA<sub>DBD</sub>wt-LZ-HilD<sub>221-309</sub> fue inducida adicionando 1 mM de IPTG al medio de cultivo. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras indican la desviación estándar, \*\*\* datos estadísticamente significativos comparados con el control ( $p < 0,05$ ).

Después de obtener la proteína quimérica LexA<sub>DBD</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub>, el plásmido pSR658-HilD6 se transformó la cepa reportera *E. coli* SU101 que contiene la fusión transcripcional *sulA-lacZ* y se probó la capacidad de dimerizar de la proteína; como controles se transformaron los plásmidos que expresan las proteínas LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-309</sub> o LexA<sub>DBD</sub>wt. La proteína LexA<sub>DBD</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub>, al igual que LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-309</sub>, reprimió la expresión de la fusión *sulA-lacZ* indicando que LZ-HilD<sub>221-309</sub> dimeriza (figura 14B).



**Figura 14. LexA<sub>DBD</sub>wt-LZ-HilD<sub>221-309</sub> dimeriza.** (A) Representación de la proteína quimérica LexA<sub>DBD</sub>wt-LZ-HilD<sub>221-309</sub>. (B) La expresión de la fusión *sulA-lacZ* se determinó en *E. coli* SU101 conteniendo el vector pSR658 (LexA<sub>DBD</sub>wt), o los plásmidos pSR658-HilD1 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-309</sub>) y pSR658-HilD6 (LexA<sub>DBD</sub>wt-LZ-HilD<sub>221-309</sub>). La actividad específica de β-galactosidasa se determinó en cultivos crecidos en LB e incubados a 37°C hasta una DO<sub>600</sub> de 1.0. La expresión de LexA<sub>DBD</sub>wt, LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>221-309</sub> y LexA<sub>DBD</sub>wt-LZ-HilD<sub>221-309</sub> fue inducida adicionando 1 mM de IPTG al medio de cultivo. Los datos representan el promedio de tres experimentos realizado por duplicado. Las barras indican la desviación estándar, \*\*\* datos estadísticamente significativos comparados con el control (p<0.001).

Posteriormente evaluamos si la fusión del motivo de LZ a HilD<sub>221-309</sub> permitía recuperar la función de la porción C-terminal de HilD. La proteína LexA<sub>DBD</sub>wt-LZ-HilD<sub>221-309</sub> indujo la expresión de la fusión *hila-cat* en la cepa de *E. coli*, al igual que la proteína LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-309</sub>, indicando que HilD<sub>221-309</sub> recupera su función al ser fusionado con un dominio de dimerización heterólogo (figura 13). En conjunto, nuestros resultados demuestran que la dimerización de HilD

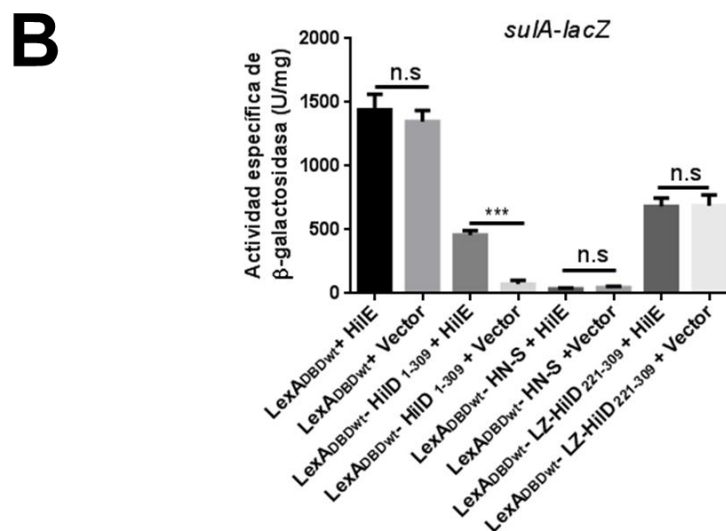
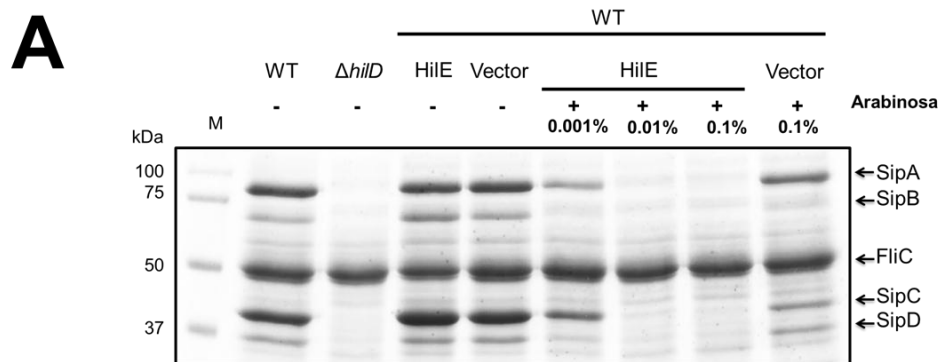


es importante para su función, ya que al fusionar un dominio de dimerización heterólogo a la región C-terminal de HilD<sub>221-309</sub> se recuperó completamente su capacidad de dimerizar y de inducir la expresión de *hilA*.

### **5.5. HilE interfiere con la dimerización de HilD**

Nuestros resultados muestran que la interacción con HilE está dada por la región central de HilD, donde también se encuentra localizado el dominio de dimerización, lo cual podría sugerir que HilE interfiere con la dimerización de HilD. Para evaluar esto, primero se clonó a *hilE* en un vector que contiene un promotor inducible por arabinosa (pMPM-A6 $\Omega$ ). Se comprobó la funcionalidad de HilE expresada a partir de este plásmido mediante un perfil de proteínas secretadas. Para ello se transformó una cepa de *S. Typhimurium* WT con el plásmido pA6-HilE1 o con el vector pMPM-A6 $\Omega$ , como control negativo. HilE reprime la expresión de los genes de SPI-1 mediante la regulación negativa que ejerce sobre HilD (Baxter et al., 2003). Si HilE, expresado a partir del plásmido pMPM-A6-hilE, es funcional, se esperaría que reprima la expresión de los genes de SPI-1, incluyendo aquellos que codifican para las proteínas efectoras secretadas al medio de cultivo. Se probaron varias concentraciones de L-arabinosa para observar la concentración mínima requerida para reprimir la secreción de las proteínas y tenerlo en cuenta para futuros experimentos. HilE expresada a partir del pA6-HilE1, pero no el vector (pMPM-A6 $\Omega$ ), es capaz de reprimir la secreción de las proteínas SipA, SipB, SipC y SipD, indicando que la proteína HilE expresada a partir de ese plásmido es funcional (figura 15A). Luego, la cepa reportera del sistema de dos híbridos de interacción proteína-proteína basado en LexA, *E. coli* SU101, fue cotransformada con los plásmidos que expresan las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + HilE, respectivamente. Como control se utilizó la misma cepa reportera cotransformada con los

plásmidos que expresan las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + el vector, LexA<sub>DBDwt</sub>-HN-S + Hile, LexA<sub>DBDwt</sub>-HN-S + el vector, LexA<sub>DBD</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> + Hile, LexA<sub>DBD</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> + el vector, LexA<sub>DBDwt</sub> + Hile o LexA<sub>DBDwt</sub> + el vector. LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> reprimió la expresión de la fusión *sula-lacZ* en presencia del vector, mostrando que LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> dimeriza; sin embargo, la represión de la fusión *sula-lacZ* mediada por LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> en presencia de Hile es significativamente menor, comparado con LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> en presencia del vector ( $p < 0.05$ ). En contraste, Hile no afectó la represión de la fusión *sula-lacZ* mediada por LexA<sub>DBDwt</sub>-HN-S o LexA<sub>DBD</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub>, indicando que el efecto de Hile es específico sobre el dominio de dimerización de HilD (figura 15B).

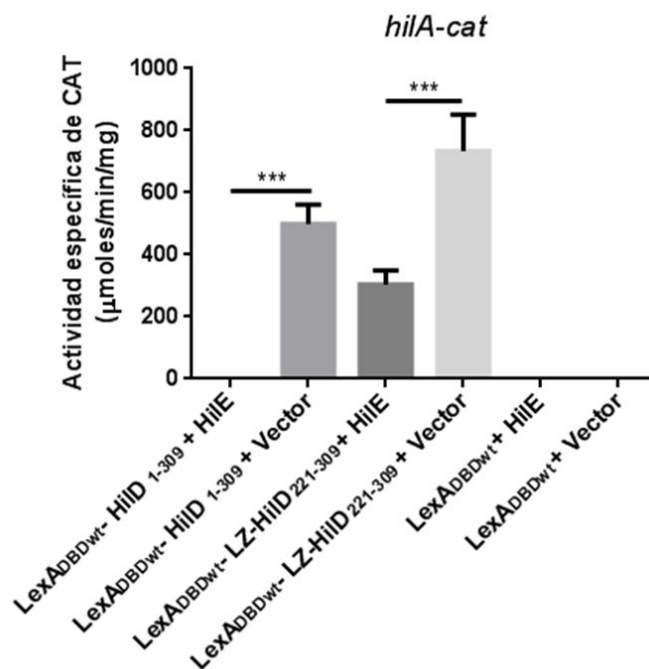


**Figura 15. Hile afecta la dimerización de HilD.** (A) La secreción de proteínas SipA, SipB, SipC y SipD codificadas en SPI-1 fue determinada en *S. Typhimurium* WT y en su derivada mutante  $\Delta hilD$ , así como en *S. Typhimurium* WT conteniendo el plásmido pA6-HilE1 que expresa a Hile a partir de un promotor inducible por arabinosa, o el vector pMPM-A6 $\Omega$ , en presencia (+) o ausencia (-) de concentraciones crecientes de L-arabinosa. Los cultivos bacterianos fueron crecidos en LB a 37°C por 9 h y los sobrenadantes fueron analizados en geles de SDS-PAGE AL 12%. FliC es una proteína flagelar cuya secreción es independiente de SPI-1. M, marcador de peso molecular (Precision Plus ProteinTM; Bio-Rad). (B) La expresión de la fusión *sulA-lacZ* se determinó en *E. coli* SU101 conteniendo los plásmidos pSR658 y pA6-HilE1 (LexA<sub>DBDwt</sub> + HilE), pSR658 y pMPM-A6 $\Omega$  (LexA<sub>DBDwt</sub> + Vector), pSR658-HilD1 y pA6-HilE1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + HilE), pSR658-HilD1 y pMPM-A6 $\Omega$  (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + Vector), pSR658-HNS y pA6-HilE1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS + HilE) o pSR658-HNS y pMPM-A6 $\Omega$  (LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS + Vector), pSR658-HilD6 y pA6-HilE1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> + HilE) o pSR658-HilD6 y pMPM-A6 $\Omega$  (LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> + Vector). La actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa se determinó en cultivos crecidos en LB incubados a 37°C en agitación hasta una OD<sub>600</sub> de 1.0. La expresión de LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS y LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> fue inducida adicionando 1 mM de IPTG al medio de cultivo, y la expresión de Hile fue inducida adicionando 0.1% de L-arabinosa. Los datos representan el promedio de tres experimentos realizados por duplicado. Las barras indican la desviación estándar, \*\*\* datos estadísticamente significativos comparados con el valor alcanzado en ausencia de Hile ( $p < 0,001$ ).

## 5.6. Hile afecta la actividad de HilD por un mecanismo independiente de la dimerización

Los resultados anteriores demuestran que Hile afecta la dimerización de HilD por interactuar con su región central, donde se encuentra el dominio de dimerización. Sin embargo, nuestros resultados indican que Hile también interactúa con la porción C-terminal de HilD, que contiene el dominio de unión a DNA, lo que sugiere que Hile podría también afectar directamente la unión al DNA (figura 5B). Para evaluar esto, se analizó el efecto del Hile sobre la capacidad de las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> de inducir la expresión de la fusión *hilA-cat* en la cepa de *E. coli* MC4100. La presencia de Hile abolió completamente la capacidad de LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> de inducir la expresión de *hilA* (figura 16). De manera interesante, Hile también tuvo un efecto negativo sobre la actividad de LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub>, debido a que en presencia de Hile, se disminuyó la capacidad de la proteína quimérica LZ-HilD<sub>221-309</sub> de inducir la expresión de *hilA* (figura 16); sin embargo, la presencia de Hile no tuvo efecto sobre la dimerización de dicha proteína quimérica (figura 15B). En conjunto,

estos resultados demuestran que HilE tiene un efecto en la actividad de HilD independiente del efecto observado sobre la dimerización.

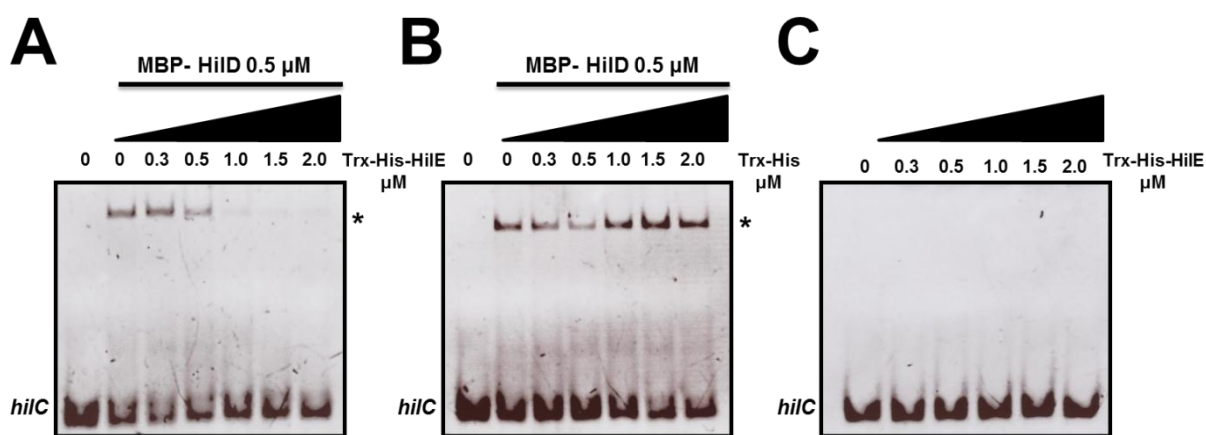


**Figura 16. HilE afecta la actividad de HilD por un mecanismo independiente de la dimerización.** La expresión de la fusión *hilA-cat*, contenida en el plásmido *phlA-cat1*, se determinó en *E. coli* MC4100 conteniendo los plásmidos pSR658 y pK6-HilE1 (LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup> + HilE), pSR658 y pMPM-K6Ω (LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup> + Vector), pSR658-HilD1 y pK6-HilE1 (LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup>-HilD<sub>1-309</sub> + HilE), pSR658-HilD1 y pMPM-K6Ω (LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup>-HilD<sub>1-309</sub> + Vector), pSR658-HilD6 y pA6-HilE1 (LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> + HilE) o pSR658-HilD6 y pMPM-A6Ω (LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> + Vector). La actividad específica de CAT se determinó en cultivos crecidos en LB e incubados a 37°C. La expresión de LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup>, LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup>-HilD<sub>1-309</sub> y LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> fue inducida adicionando 1 mM de IPTG al medio de cultivo, y la expresión de HilE fue inducida adicionando 0.1% de L-arabinosa. Los datos representan el promedio de tres experimentos realizados por duplicado. Las barras indican la desviación estándar, \*\*\* datos estadísticamente significativos comparados con el valor alcanzado en ausencia de HilE ( $p < 0,001$ ).

### 5.7. HilE inhibe la unión de HilD al DNA

Nuestros resultados sugieren que HilE inhibe la actividad de HilD, interaccionando con sus dominios de dimerización y unión al DNA, lo cual apoya que HilE inhibe la unión al DNA de HilD. Para determinar esto, se realizaron EMSAs competitivos utilizando las proteínas

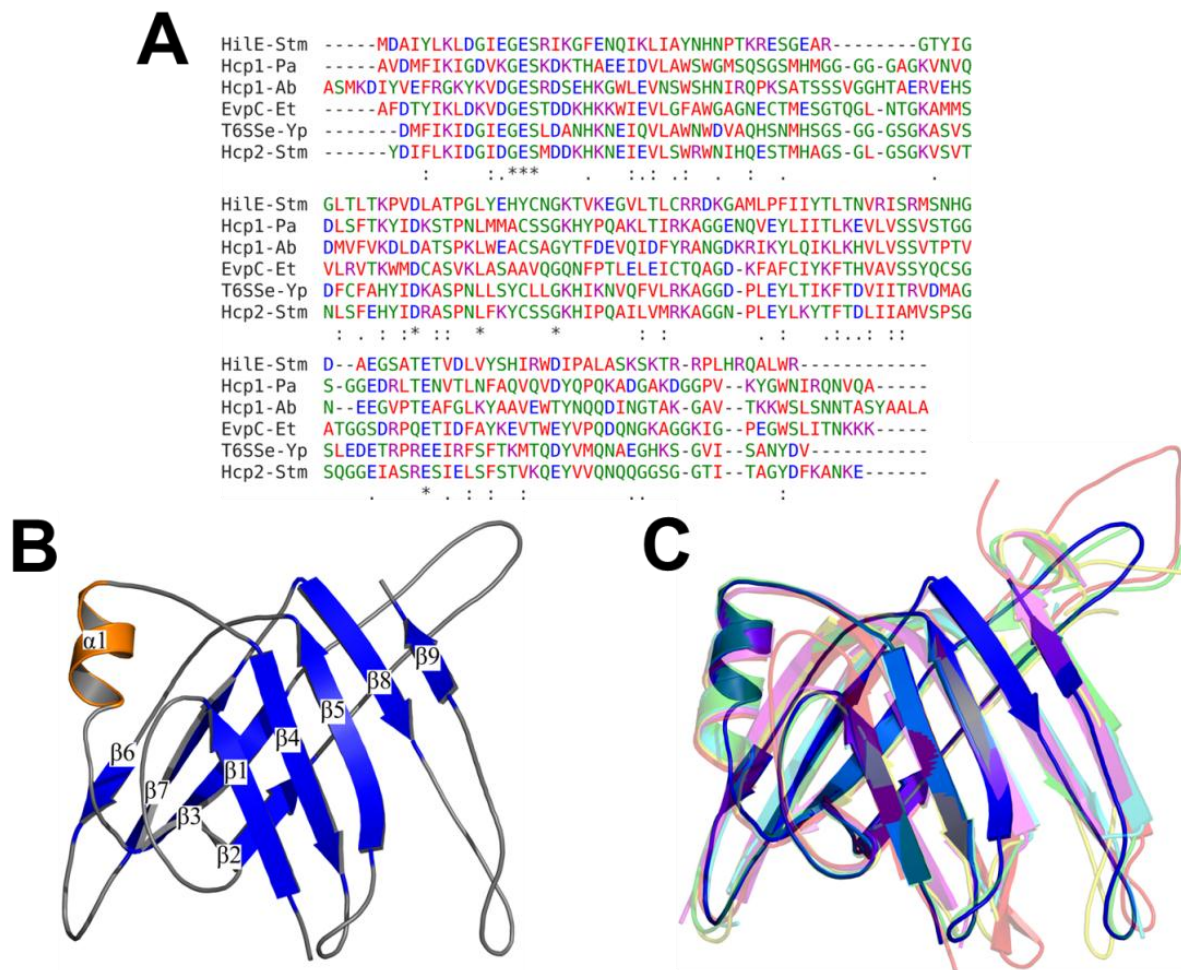
purificadas MBP-HilD, Trx-His-HilE, Trx-His y un fragmento de DNA de 50 pb de la región reguladora de *hilC*, que contiene el sitio de unión de HilD. Se incubó el fragmento de *hilC* con concentraciones constantes de MBP-HilD (0.5  $\mu\text{M}$ ) y concentraciones crecientes de Trx-His-HilE (0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0  $\mu\text{M}$ ). Como control, se realizaron reacciones incubando el fragmento de *hilC* con Trx-His en lugar de Trx-His-HilE. A partir de una concentración de 1.0  $\mu\text{M}$ , Trx-His-HilE, pero no Trx-His, inhibió la formación del complejo MBP-HilD-DNA, lo cual indica que HilE interfiere con la unión de HilD al DNA (figura 17A y B). Como control adicional, se probó si Trx-His-HilE, puede unir por sí solo, a la región reguladora de *hilC* de 50 pb. Incluso a la mayor concentración probada (2  $\mu\text{M}$ ), HilE es incapaz de unir al DNA (figura 17C). Estos resultados demuestran que la interacción de HilE inhibe la unión de HilD al DNA.



**Figura 17. HilE inhibe la unión de HilD al DNA.** EMSAs competitivos no radioactivos fueron realizados para analizar el efecto de HilE sobre la unión de HilD al DNA. Un fragmento de 50 pb de DNA de *hilC* conteniendo el sitio de unión de HilD fue incubado con MBP-HilD (0.5  $\mu\text{M}$ ) y concentraciones crecientes (0, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0  $\mu\text{M}$ ) de (A) Trx-His-HilE o (B) Trx-His. (C) EMSA para evaluar la unión de HilE al DNA. El fragmento de 50 pb de *hilC* fue incubado con concentraciones crecientes (0, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0  $\mu\text{M}$ ) de Trx-His-HilE purificada. Los complejos DNA-proteína son indicados con asteriscos y fueron resueltos en geles de poliacrilamida no desnaturizante al 6% y teñidos con bromuro de etidio.

### **5.8. Hile comparte similitud de secuencia y está estructuralmente relacionada con las proteínas Hcp del sistema de secreción tipo 6 (SST6)**

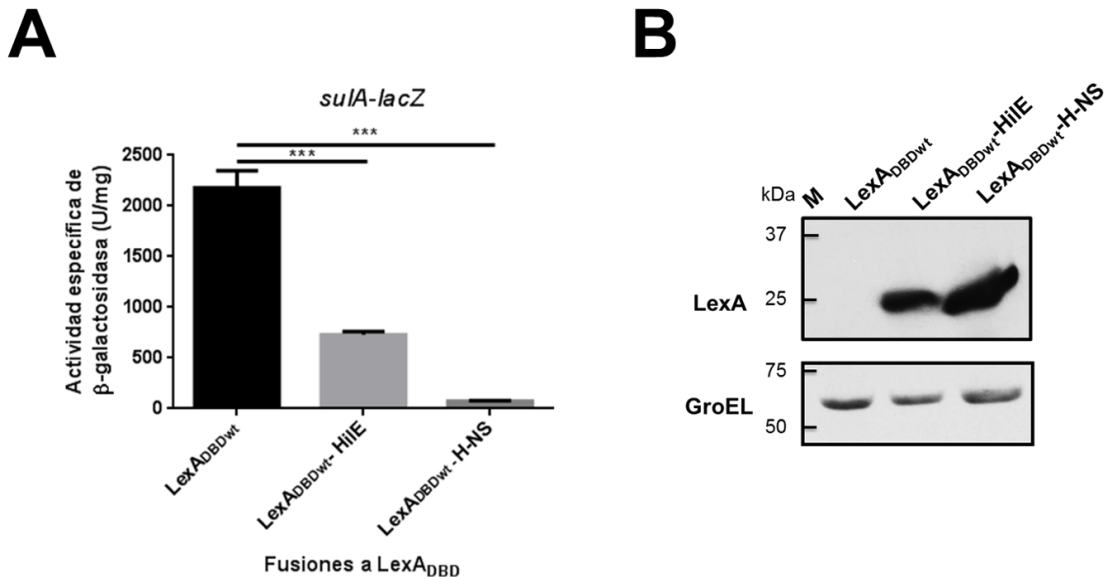
Previos estudios reportaron que Hile está codificado en una isla genómica del cromosoma de *Salmonella* y que no tiene ortólogos que se puedan predecir con base en su secuencia de aminoácidos (Baxter et al., 2003). Nuestros análisis recientes de BLASTp mostraron que Hile tiene aproximadamente 30% de identidad con proteínas relacionadas estructuralmente con el sistema de secreción tipo 6 (SST6), denominadas Hcp (del inglés, Haemolysin coregulated protein) (figura 18A). Para determinar si Hile también presenta analogía estructural con las proteínas Hcp, su secuencia fue modelada con el servidor I-TASSER (Roy et al., 2010), resultando en una estructura con un C-score de 1.07 y TM score de 0.86. La estructura predicha está compuesta por un barril  $\beta$  con dos láminas  $\beta$  con 4 y 5 hebras cada una, flanqueada por una hélice  $\alpha$  (figura 18B y C). La estructura modelada de Hile es muy similar a aquella descrita para la subunidad monomérica de las proteínas Hcp-1 de *P. aeruginosa* (Mougous et al., 2006), Hcp-1 de *Acinetobacter baumannii* (Ruiz et al., 2015), Evc de *Edwardsiella tarda* (Jobichen et al., 2010), un efector del TSS6 de *Yersinia pestis* (E. V. Filippova, et al, datos no publicados) y Hcp-2 de *S. Typhimurium* (Lin et al., 2017), mostrando valores de TM iguales a 0.95, 0.89, 0.88 y 0.78, respectivamente, con estas proteínas. Los valores de TM  $> 0.5$  indican que las proteínas comparten la misma topología. Estos resultados indican que existe una similaridad estructural entre Hile y las proteínas Hcp.



**Figura 18. Comparación de la secuencia y estructura de HilE con las proteínas Hcp.** (A) Alineamiento de secuencia de HilE con cinco proteínas Hcp: Hcp1 de *P. aeruginosa* (Hcp1-Pa), Hcp1 de *A. baumannii* (Hcp1-Ab), EvpC de *E. tarda* (EvpC-Et), T6SSe de *Y. pestis* (T6SSe-Yp) y Hcp2 de *S. Typhimurium* (Hcp2-Stm). (B) Representación de Ribbon de la estructura predicha de HilE, coloreada de acuerdo a la estructura secundaria: láminas  $\beta$  (azul),  $\alpha$ -hélice (naranja), bucle (gris). (C) Superposición de la estructura predicha de HilE, con las estructuras resueltas de Hcp1-Pa (PDB 4KSR) (rojo), Hcp1-Ab (PDB 4W64) (verde), EvpC-Et (PDB 3EAA) (amarillo), T6SSe-Yp (PDB 3V4H) (azul celeste) and Hcp2-Stm (PDB 5XEU) (magenta). El número de PDB para cada estructura está indicado.

### 5.9. HileE forma dímeros y el modelo de la estructura cuaternaria indica que podría formar hexámeros

Se ha visto que las proteínas Hcp forman hexámeros (Mougous et al., 2006; Records, 2011); sin embargo, el estado oligomérico de HileE es desconocido. Para investigar si HileE podría interactuar consigo misma, primero se evaluó si HileE era capaz de dimerizar mediante el uso del sistema de interacción proteína-proteína basado en LexA. Para esto se clonó el gen *hileE* en el plásmido pSR658 en fase con la secuencia que codifica para LexA<sub>DBDwt</sub>, obteniéndose el plásmido pSR658-HileE1 que expresa la proteína LexA<sub>DBDwt</sub>-HileE, el cual posteriormente se transformó a la cepa reportera *E. coli* SU101. Como controles se analizaron transformantes con el vector que expresa a LexA<sub>DBDwt</sub> (control negativo) y con el plásmido que expresa la proteína de fusión LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS (control positivo). La expresión de la fusión *sulA-lacZ* disminuyó en presencia de las proteínas de fusión LexA<sub>DBDwt</sub>-HileE y LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS (figura 19A), lo cual indica que HileE puede formar dímeros. Asimismo, la expresión de estas proteínas fue confirmada por Western blot (figura 19B).

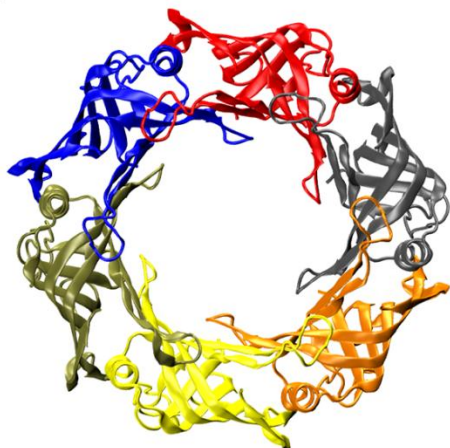




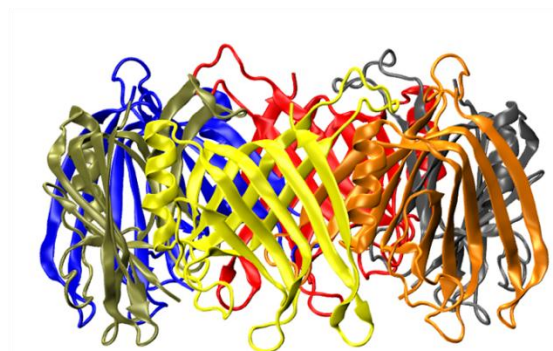
**Figura 19. HilE forma dímeros.** (A) La expresión de la fusión *sulA-lacZ* se determinó en *E. coli* SU101 conteniendo el vector pSR658 (LexA<sub>DBDwt</sub>), o los plásmidos pSR658-HilE1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilE) o pSR658-HNS (LexA<sub>DBDwt</sub>-HNS). La actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa se determinó en cultivos crecidos en LB e incubados a 37°C hasta una DO<sub>600</sub> de 1.0. La expresión de LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilE y LexA<sub>DBDwt</sub>-HNS fue inducida adicionando 1 mM de IPTG al medio de cultivo. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras indican la desviación estándar, \*\*\* datos estadísticamente significativos comparados con el valor alcanzado en LexA<sub>DBDwt</sub> ( $p < 0,001$ ). (B) Western blot para analizar la expresión de las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilE y LexA<sub>DBDwt</sub>-HNS. Extractos de proteína total provenientes de *E. coli* SU101 conteniendo el vector pSR658, el plásmido pSR658-HilE1 o pSR658-HNS fueron analizados con anticuerpos policlonales Anti-LexA o Anti-GroEL. Las muestras fueron obtenidas de los cultivos crecidos en LB con 1mM de IPTG e incubados a 37°C hasta una DO<sub>600</sub> de 1.0.

Debido a que este sistema genético de interacción, nos da información de la capacidad de dimerizar de las proteínas pero no de la formación de oligómeros, y se ha visto que las proteínas Hcp forman hexámeros, se construyó un modelo de la estructura cuaternaria de HilE, mediante la superposición de cada subunidad monomérica de HilE sobre el molde del hexámero de Hcp-1 de *A. baumannii* (PDB 4W64) obtenido por cristalografía. El modelo resultante, indica que HilE podría formar hexámeros de manera similar que las proteínas Hcp (figura 20). No obstante, la comprobación experimental y la implicación biológica de este hallazgo quedan por investigarse. En conjunto, nuestros resultados indican que HilE probablemente forme hexámeros similares a aquellos formados por las proteínas Hcp del SST6.

**A**



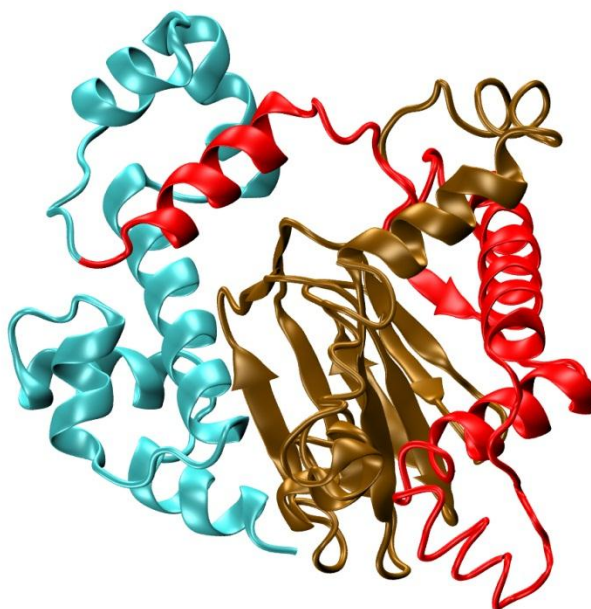
**B**



**Figura 20. Modelo del hexámero de Hile.** (A) Vista superior y (B) Vista lateral de una representación de Ribbon del modelo del hexámero de Hile. Cada subunidad monomérica está coloreada diferencialmente para resaltar su organización.

### **5.10. Modelo de la estructura terciaria de HilD**

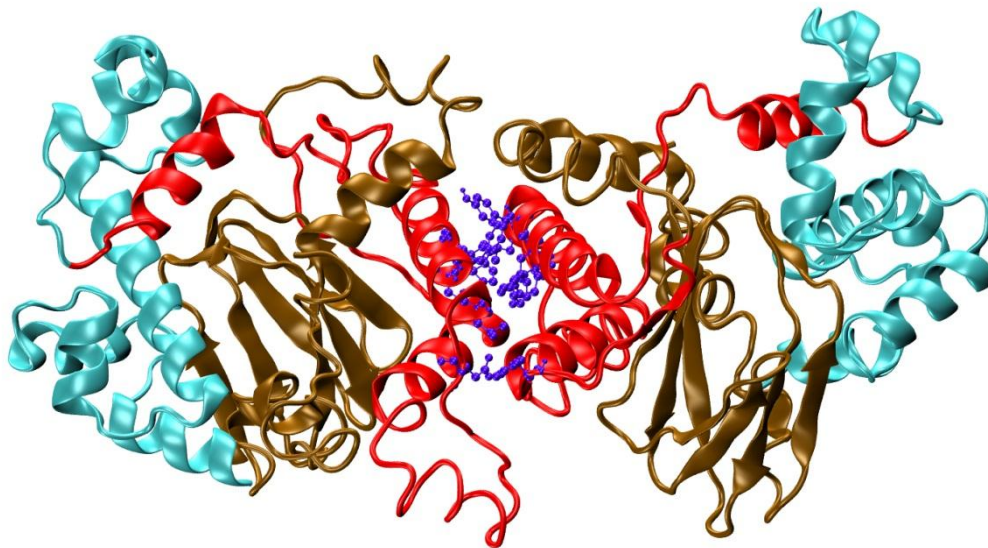
Actualmente no se cuenta con la estructura cristalográfica de HilD; sin embargo, mediante el uso del servidor I-TASSER (Roy et al., 2010) se predijo la estructura terciaria de HilD, tomando como molde la estructura cristalográfica de ToxT (PDB 3GBG), un regulador transcripcional de la familia AraC de *V. cholerae* (Lowden et al., 2010). El modelo obtenido tiene un C-score de -0.99 y un TM score de 0.59. La superposición del modelo de HilD y la estructura cristalográfica de ToxT muestra que son muy similares, con un valor de RMSD de 0.95 Å. Similar a ToxT, el modelo de HilD comprende varios dominios. El N-terminal, está compuesto por una región desordenada de aproximadamente 20 aminoácidos, seguida de 9 hebras  $\beta$  que conforman un sándwich  $\beta$ , con una hélice  $\alpha$  que interconecta una de las hebras. La región central está compuesta de 2 hélices  $\alpha$  y está seguida de la región C-terminal que contiene dos motivos de HTH, interconectados por una hélice  $\alpha$  (figura 21). Los dominios están representados en la figura de acuerdo a los resultados obtenidos experimentalmente mediante el sistema de interacción proteína-proteína basado en LexA: el N-terminal (ocre) comprendiendo los aminoácidos 1 a 130, la región central (roja), aminoácidos 131 a 220 y el C-terminal (azul), aminoácidos 221-309. Es importante notar que en el modelo obtenido de HilD, parte de los aminoácidos representados en la región central parecen ser parte de la región C-terminal de la proteína.



**Figura 21. Modelo de la estructura terciaria de HilD.** Representación de Ribbon de la estructura terciaria de HilD modelada con el servidor I-TASSER de acuerdo a la estructura cristalográfica de ToxT (PDB 3GBG). Las regiones de HilD se muestran en diferentes colores: N-terminal (aminoácidos 1 a 130) en ocre, región central (aminoácidos 131 a 220) en rojo, dominio de unión a DNA (aminoácidos 221-309) en azul.

### 5.11. Predicción de aminoácidos de HilD involucrados en la dimerización

Nuestros resultados indican que HilD forma dímeros por su región central (figura 12). Para tratar de definir los aminoácidos involucrados en la dimerización, se modeló el dímero de HilD mediante el uso del servidor ClusPro (<https://cluspro.bu.edu>) (Comeau et al., 2004). El modelo resultante, indica que cada monómero de HilD está asociado a través de una interfaz hidrofóbica localizada en la región central de la proteína (rojo) (figura 22), lo cual corresponde con los hallazgos encontrados experimentalmente.



**Figura 22. Modelo del dímero de HilD.** Representación de Ribbon del homodímero de HilD modelada con el servidor ClusPro, que indica la interacción de cada monómero de HilD por su región central (rojo). En violeta se muestran algunos aminoácidos que participan en la dimerización.

Posteriormente, se realizó una mutagénesis *in silico* por alanina a través del servidor Robetta (<http://robetta.bakerlab.org>). Se eligieron algunos aminoácidos que podrían tener un papel importante en la dimerización, de acuerdo al cambio de energía libre del Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ). Entre mayor sea el  $\Delta\Delta G$ , más se alejará del equilibrio y por lo tanto la probabilidad de que el dímero se disocie será mayor (tabla 4).

**Tabla 4. Aminoácidos probablemente involucrados en la dimerización de HilD**

Aminoácido	HilD-cadena A $\Delta\Delta G$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )	HilD-cadena B $\Delta\Delta G$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )
Y180A	1.15	2.36
F181A	1.15	2.36
F184A	2.07	1.63
L177A	1.16	0.78

F139A	1.61	1.55
-------	------	------

### 5.12. Los aminoácidos L177, L178, Y180, F181 y F184 no están involucrados en la dimerización de HilD

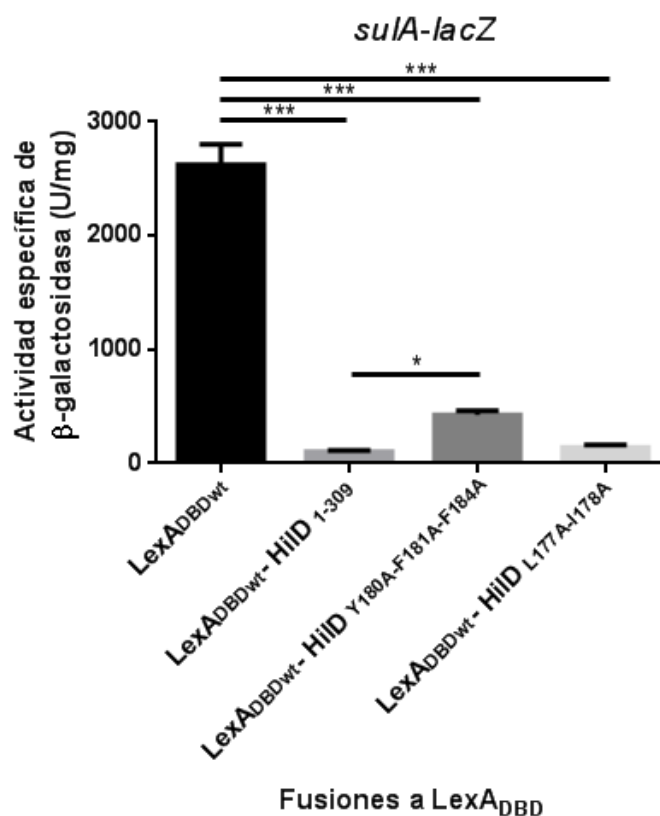
De acuerdo con los resultados arrojados por el análisis de mutagénesis *in silico* por alanina, se eligieron los aminoácidos Y180, F181, F184 y se construyó una mutante de HilD en la cual estos tres aminoácidos fueron sustituidos por alanina. De manera interesante, la L177 hace parte de un grupo de leucinas conservadas que se ha visto están involucradas en la dimerización del regulador AraC y XylS y en la función de UreR (Poore et al., 2001; Ruiz et al., 2003; Soisson et al., 1997). Un alineamiento de HilD con AraC de *E. coli*, mostró que esta leucina está conservada y corresponde con la L150 de AraC. Asimismo, la L151 de AraC, también involucrada en la dimerización de este regulador, corresponde con la I178 de HilD (figura 23), por lo cual, también se generó la sustitución por alanina de los aminoácidos L177 e I178 de HilD.



**Figura 23. Alineamiento de las secuencias de HilD y AraC.** Se muestra la parte de la secuencia donde se observan la leucinas conservadas de AraC y los aminoácidos correspondientes en HilD.

Los productos obtenidos por PCR, conteniendo las mutaciones, se clonaron en el plásmido pSR658, generando los plásmidos pSR658-HilD7 y pSR658-HilD8, que expresan las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181-F184A</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>L177A-I178A</sub>, respectivamente. Posteriormente, cada uno de estos plásmidos se transformó en la cepa reportera de *E. coli* SU101 y se probó su capacidad para dimerizar. Como controles, la cepa reportera se transformó con el vector, que

expresa LexA<sub>DBDwt</sub> y con el plásmido que expresa la proteína de fusión LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>. La expresión de la fusión *sulA-lacZ* disminuyó en presencia de las proteínas de fusión LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>L177A-I178A</sub> (figura 24), lo cual indica que HilD puede formar dímeros, a pesar de las sustituciones por alanina en los aminoácidos Y180, F181, F184, L177 e I178, descartando estos aminoácidos como importantes para la dimerización de HilD.

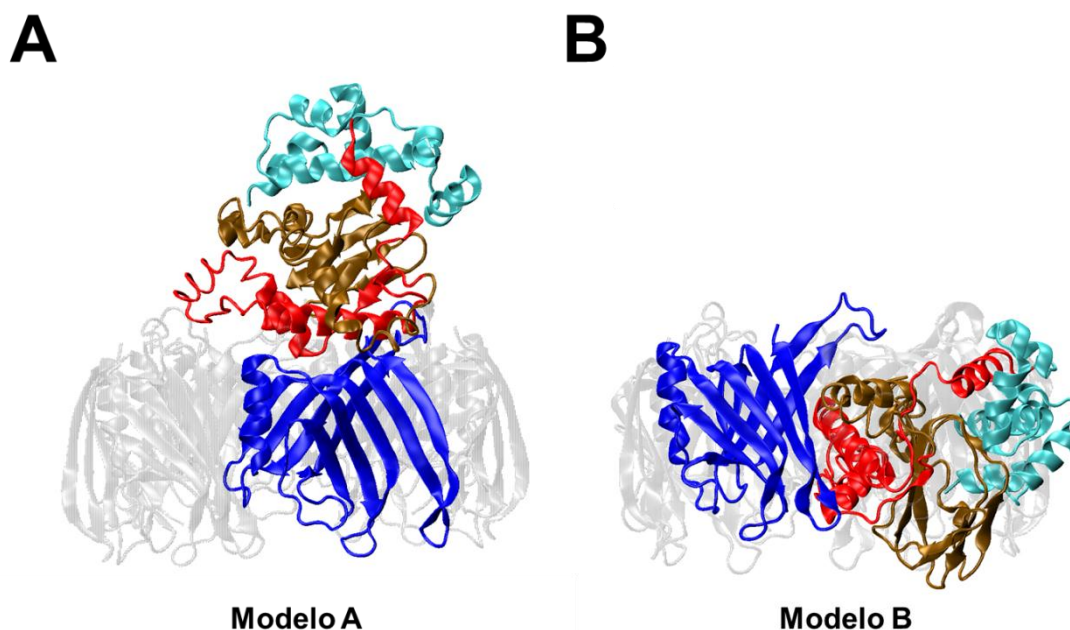


**Figura 24. Las proteínas mutantes HilD<sub>Y180-F181-F184</sub> y HilD<sub>L177-I178</sub> forman dímeros.** La expresión de la fusión *sulA-lacZ* se determinó en *E.coli* SU101 conteniendo el vector pSR658 (LexA<sub>DBDwt</sub>), o los plásmidos pSR658-HilD1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>), pSR658-HilD7 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180-F181-F184</sub>) o pSR658-HilD8 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>L177-L178</sub>). La actividad específica de β-galactosidasa se determinó en cultivos crecidos en LB e incubados a 37°C hasta una DO<sub>600</sub> de 1.0. La expresión de LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180-F181-F184</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>L177-L178</sub> fue inducida adicionando 1 mM de IPTG al medio de cultivo. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras indican la desviación estándar, \*\*\* datos estadísticamente significativos comparados con el valor alcanzado en LexA<sub>DBDwt</sub> ( $p < 0,05$ ).

### **5.13. Predicción de aminoácidos de HilD involucrados en la interacción con Hile**

Nuestros resultados indican que HilD interacciona por su región central y por el C-terminal con Hile (figura 5B). A partir de los monómeros de HilD y Hile modelados anteriormente, se construyó un modelo de interacción usando el servidor ClusPro (<https://cluspro.bu.edu>) (Comeau et al., 2004). Análisis de los modelos obtenidos, revelan que podrían existir dos formas probables de interacción, las cuales involucran la región central de HilD y dos regiones distintas de Hile (figura 25). En el modelo A, HilD interacciona por su región central con la cara superior de Hile. Si se considera a Hile como un hexámero, esta forma de interaccionar con HilD no impediría la formación de la estructura hexamérica (figura 25A). Por otro lado, en el modelo B, HilD interacciona por su región central con la cara lateral del monómero de Hile. En este modelo, probablemente HilD interfiera con la formación del hexámero de Hile (figura 25B). Cabe mencionar, que no fue posible obtener un modelo que mostrara la interacción de la región C-terminal de HilD con Hile.





**Figura 25. Modelos de interacción de HilD con HilE.** Representación de Ribbon que muestra la interacción de HilD con HilE modelada con el servidor Cluspro. (A) Modelo A, la región central de HilD interacciona con la cara superior de HilE. (B) Modelo B, la región central de HilD interacciona con la cara lateral de HilE. Las regiones de HilD se muestran en diferentes colores: N-terminal (aminoácidos 1 a 130) en ocre, región central (aminoácidos 131 a 220) en rojo, dominio de unión a DNA (aminoácidos 221-309) en azul. HilE en azul rey.

Para definir los aminoácidos de la región central de HilD involucrados en la interacción con HilE en cada uno de estos modelos, se realizó una mutagénesis *in silico* por alanina con el servidor Robetta (<http://robetta.bakerlab.org>). Se eligieron algunos aminoácidos de HilD que podrían participar en la interacción de acuerdo a los valores de  $\Delta\Delta G$  para cada modelo (tabla 5).

**Tabla 5. Aminoácidos de HilD probablemente involucrados en la interacción con HilE**

Aminoácidos	Modelo A	Modelo B
	$\Delta\Delta G$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G$ (Kcal mol <sup>-1</sup> )
Y180A	1.7	2.0
F184A	1.7	1.58



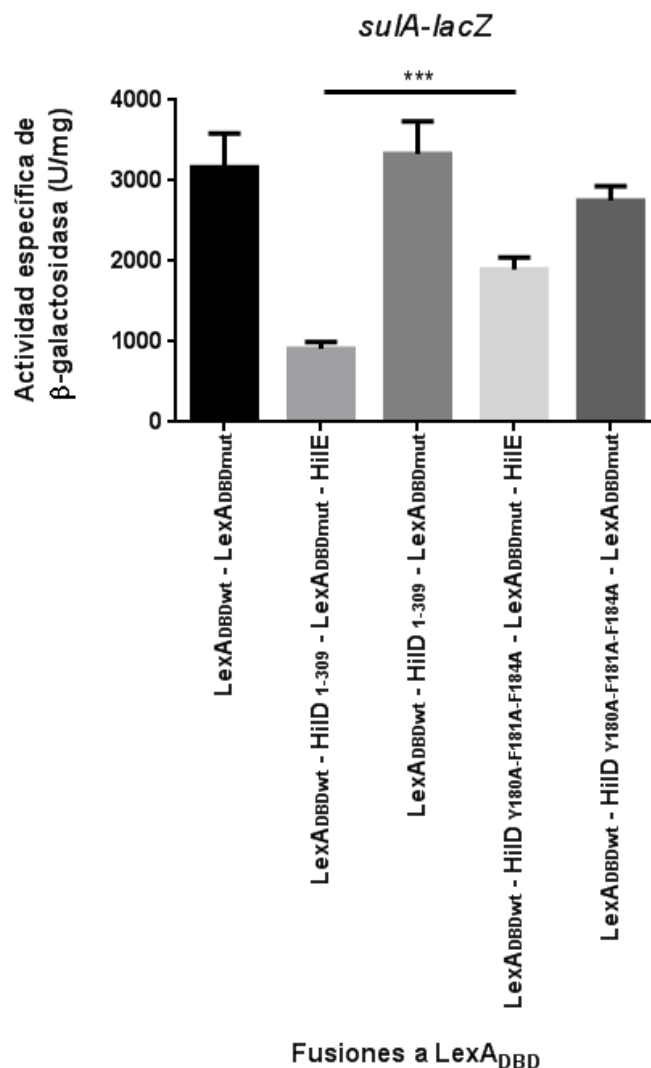
F139A	3.4	2.05
R191	1.7	-
E118	-	1.52

De manera interesante, los aminoácidos Y180, F184 y F139 de HilD, parecen ser importantes para la interacción con HilE en ambos modelos.

#### **5.14. Los aminoácidos Y180, F181 y F184 están involucrados en la interacción de HilD con HilE**

Debido a que los aminoácidos Y180 y F184 se mutaron previamente, junto con F181, para probar su efecto en la dimerización de HilD, y al observar que estos aminoácidos también podrían estar involucrados en su interacción con HilE, se utilizó esta misma mutante para probar ahora su efecto en la interacción con la proteína HilE. Para esto, los plásmidos pSR658-HilD7 y pSR659-HilE1, los cuales expresan a las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> y LexA<sub>DBDmut</sub>-HilE, respectivamente, se transformaron en la cepa reportera *E. coli* SU202 que contiene en su genoma la fusión *sulA-lacZ* con un sitio de unión de LexA híbrido (Daines and Silver, 2000; Dmitrova et al., 1998). La expresión de la fusión *sulA-lacZ* disminuyó drásticamente en presencia de las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>-HilE, usadas como control positivo de la interacción; sin embargo, la disminución de la expresión de la fusión *sulA-lacZ* fue menos evidente en presencia de las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>-HilE y estadísticamente diferente con respecto al control positivo (p<0.001). En contraste, la expresión de la fusión *sulA-lacZ* no disminuyó en presencia de las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>, usadas como controles negativos

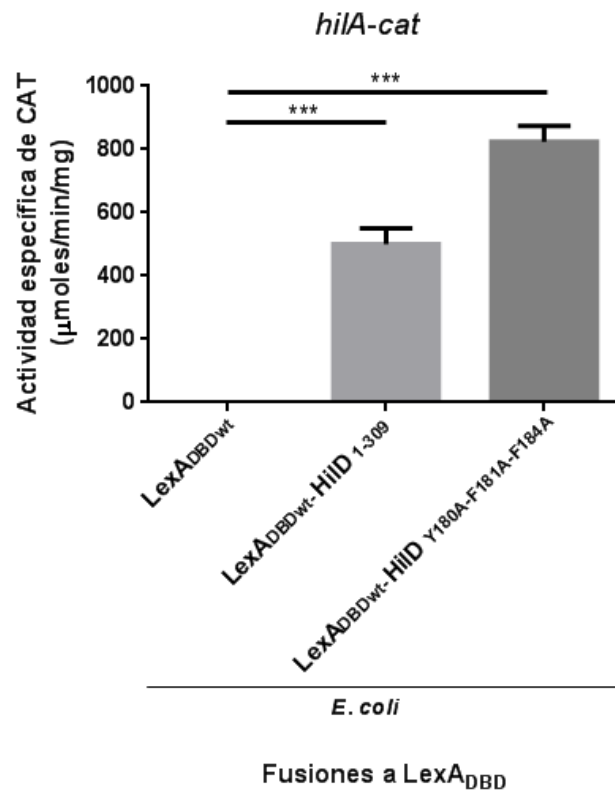
(figura 26). Estos resultados sugieren que las mutaciones Y180A, F181A y F184A afectan parcialmente la interacción de HilD con HilE.



**Figura 26. Los aminoácidos de HilD Y180, F181 Y F184 son requeridos para su interacción con HilE.** La expresión de la fusión *sulA-lacZ* se determinó en *E.coli* SU202 conteniendo los plásmidos pSR658 y pSR659 (LexA<sub>DBD</sub>wt + LexA<sub>DBD</sub>mut), pSR658-HilD1 y pSR659-HilE1 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-309</sub> + LexA<sub>DBD</sub>mut-HilE), pSR658-HilD1 y pSR659 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-309</sub> + LexA<sub>DBD</sub>mut), pSR658-HilD7 y pSR659-HilE1 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> + LexA<sub>DBD</sub>mut-HilE) y pSR658-HilD7 y pSR659 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> + LexA<sub>DBD</sub>mut). La actividad de  $\beta$ -galactosidasa se determinó en cultivos crecidos en LB e incubados a 37°C hasta una DO<sub>600</sub> de 1.0. La expresión de LexA<sub>DBD</sub>wt, LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>Y180-F181-F184</sub>, LexA<sub>DBD</sub>mut y LexA<sub>DBD</sub>mut-HilE fue inducida adicionando 1 mM de IPTG al medio de cultivo. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. \*\*\* datos estadísticamente significativos comparados con el alcanzado en ausencia de LexA<sub>DBD</sub>mut-HilE ( $p < 0,05$ ).

### 5.15. Las mutaciones Y180A, F181A y F184A no afectan la actividad de la proteína HilD

Después de observar el efecto de las mutaciones Y180A, F181A y F184A sobre la dimerización de HilD y su interacción con HilE, investigamos si podrían afectar la actividad de HilD. Para esto, se analizó si la proteína LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-Y181A-F184A</sub> induce la expresión de *hila*. Se transformó el plásmido que expresa la proteína LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> en la cepa de *E. coli* MC4100 que contiene la fusión transcripcional *hila-cat*. Los plásmidos que expresan las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub> también fueron transformados en esta cepa, como controles positivo y negativo, respectivamente. LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> indujo la expresión de *hila-cat* a niveles incluso mayores a los alcanzados con LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> (figura 27), indicando que las mutaciones Y180A, F181A y F184A no afectan la actividad de HilD.



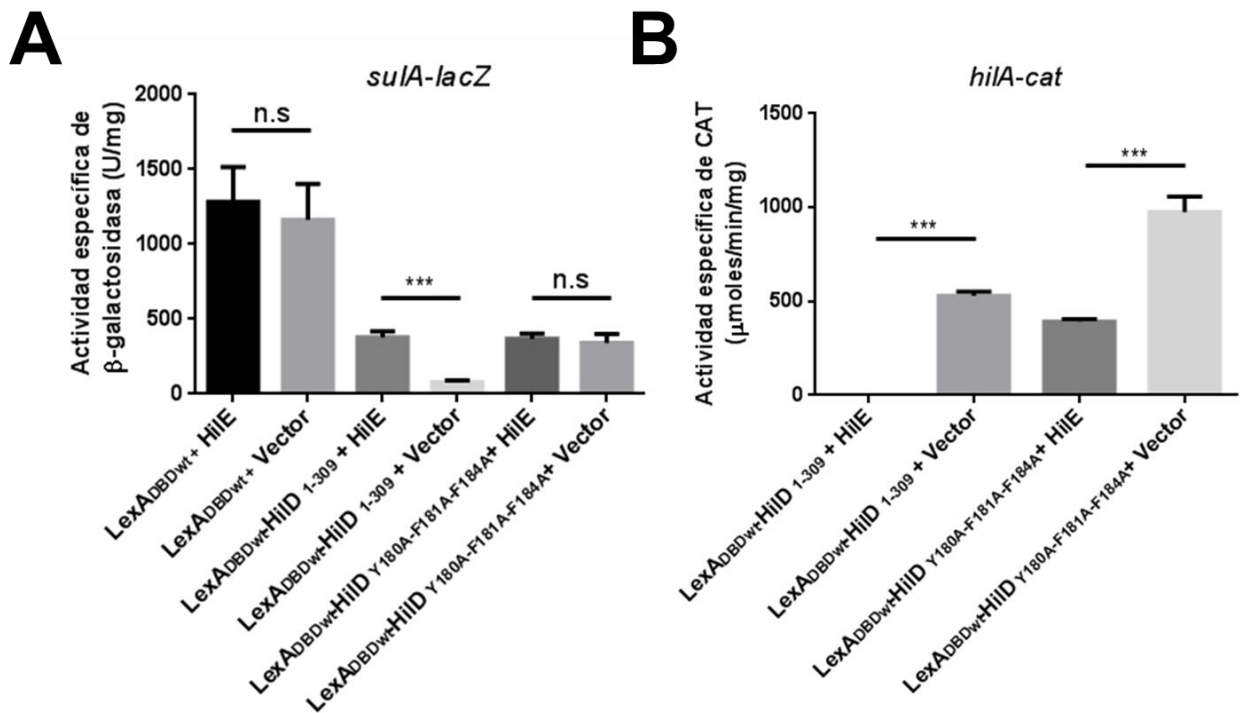
**Figura 27. HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> induce la expresión de *hila*.** La expresión de la fusión *hila-cat*, contenida en el plásmido *phila-cat1*, se determinó en *E. coli* MC4100 conteniendo el vector pSR658 (LexA<sub>DBDwt</sub>) o los plásmidos pSR658-HilD1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>) o pSR658-HilD7 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub>). La actividad específica de CAT se determinó en cultivos crecidos en LB e incubados a 37°C. La expresión de LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180-F181-F184</sub> fue inducida adicionando 1 mM de IPTG al medio de cultivo. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras indican la desviación estándar, \*\*\* datos estadísticamente significativos comparados con el control ( $p < 0,05$ ).

### 5.16. HilE no inhibe la dimerización de la mutante de HilD en los aminoácidos Y180, F181, F184, pero sí afecta su actividad

Para determinar si estas mutaciones también afectan la capacidad de HilE de inhibir la dimerización de HilD, la cepa reportera del sistema de dos híbridos de interacción proteína-proteína basado en LexA, *E. coli* SU101, fue cotransformada con los plásmidos que expresan las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> + HilE, respectivamente. Como control se utilizó la misma cepa reportera cotransformada con los plásmidos que expresan las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> + el vector, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + HilE, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + el vector, LexA<sub>DBDwt</sub> + HilE o LexA<sub>DBDwt</sub> + el vector. HilE no afectó la represión de la fusión *sulA-lacZ* mediada por LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub>; en contraste, con el control positivo LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, cuya dimerización sí es afectada por la presencia de HilE (figura 28A). Estos resultados indican que HilE no afecta la dimerización de la cepa mutante de HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub>.

Adicionalmente, se investigó si HilE tendría efecto sobre la actividad de HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub>. Para esto, se evaluó la capacidad de la proteína LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> de inducir la expresión de *hila* en presencia de HilE. La cepa de *E. coli* MC4100 que expresa la fusión transcripcional *hila-cat*, se cotransformó con los plásmidos que expresan las proteínas LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> + HilE, respectivamente. Como controles, se analizó la expresión de *hila-cat* en la cepa de *E. coli* conteniendo los plásmidos que expresan LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-</sub>

F181A-F184A + vector, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + HilE y LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + el vector. La presencia de HilE tuvo un efecto negativo sobre la actividad de LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub>, debido a que en presencia de HilE se disminuyó su capacidad de inducir la expresión de *hila* (figura 28B). Sin embargo, este efecto podría considerarse parcial, si se considera que la presencia de HilE abolió por completo la capacidad de LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> (silvestre) de inducir la expresión de *hila*. En conjunto, estos resultados demuestran que HilE tiene un efecto negativo parcial en la actividad de HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub>, pero no afecta su dimerización. Esto podría explicarse por el hecho de que HilE ya no interacciona con la región de dimerización de HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub>, pero probablemente sí con su región de unión al DNA.



**Figura 28. HilE no inhibe la dimerización de HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> pero si afecta su actividad.** **A.** La expresión de la fusión *sulA-lacZ* se determinó en *E.coli* SU101 conteniendo los plásmidos pSR658 y pA6-HilE1 (LexA<sub>DBDwt</sub> + HilE), pSR658 y pMPM-A6Ω (LexA<sub>DBDwt</sub> + Vector), pSR658-HilD1 y pA6-HilE1(LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + HilE), pSR658-HilD1 y pMPM-A6Ω (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + Vector), pSR658-HilD7 y pA6-HilE1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> + HilE) o pSR658-HilD7 y pMPM-A6Ω (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> + Vector). **B.** La expresión de la

fusión *hila-cat*, contenida en el plásmido *philA-cat1*, se determinó en *E. coli* MC4100 conteniendo los plásmidos pSR658-HilD1 y pK6-HilE1(LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + HilE), pSR658-HilD1 y pMPM-K6Ω (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + Vector), pSR658-HilD7 y pK6-HilE1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> + HilE) o pSR658-HilD7 y pMPM-K6Ω (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> + Vector). La actividad específica de β-galactosidasa y de CAT se determinó en cultivos crecidos en LB incubados a 37°C en agitación hasta una OD<sub>600</sub> de 1.0. La expresión de LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> y LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>Y180A-F181A-F184A</sub> fue inducida adicionando 1mM de IPTG al medio. La expresión de HilE fue inducida adicionando 0.1% de L-arabinosa. Los datos representan el promedio de tres experimentos realizados por duplicado. Las barras indican la desviación estándar, \*\*\* datos estadísticamente significativos comparados con el valor alcanzado en ausencia de HilE ( $p < 0,05$ ).

### **5.17. La región N-terminal de HilD participa en la detección de señales como los ácidos grasos y sales biliares**

Varios estudios han demostrado que ciertos miembros de la familia de reguladores transcripcionales AraC/Xyls reconocen señales por su región N-terminal, las cuales pueden inducir o inhibir su actividad. Particularmente, la actividad de HilD es regulada negativamente por ácidos grasos y sales biliares. Sin embargo, se desconoce si estas moléculas interaccionan con HilD y en su caso, con qué región de la proteína.

Para investigar si HilD detecta señales por su región N-terminal, se generó una cepa de *S. Typhimurium* que expresa una variante de HilD, la cual carece de los primeros 129 aminoácidos de su región N-terminal. Anteriormente, habíamos expresado a la proteína LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>130-309</sub> a partir de plásmido y comprobado su capacidad de dimerizar e inducir la expresión de *hila*, lo cual demostraba su funcionalidad (figuras 12 y 13). Con base en este antecedente, decidimos expresar a HilD<sub>130-309</sub> a partir de su propio promotor en el cromosoma y evaluar su capacidad para detectar y responder a las señales inhibitorias descritas como importantes para la expresión de los genes de SPI-1. Para esto, se construyó la cepa  $\Delta hilD_{130-309}::kan$ , usando un método previamente reportado, basado en el sistema de recombinación con la recombinasa  $\lambda red$  (Husseiny and Hensel, 2005), en la cual el fragmento del gen que codifica para la proteína

HilD<sub>130-309</sub> fue insertado en una cepa  $\Delta hilD$ , en la misma posición del cromosoma donde se encontraría el gen *hilD* silvestre (figura 29).

### S. Typhimurium WT



### $\Delta hilD$

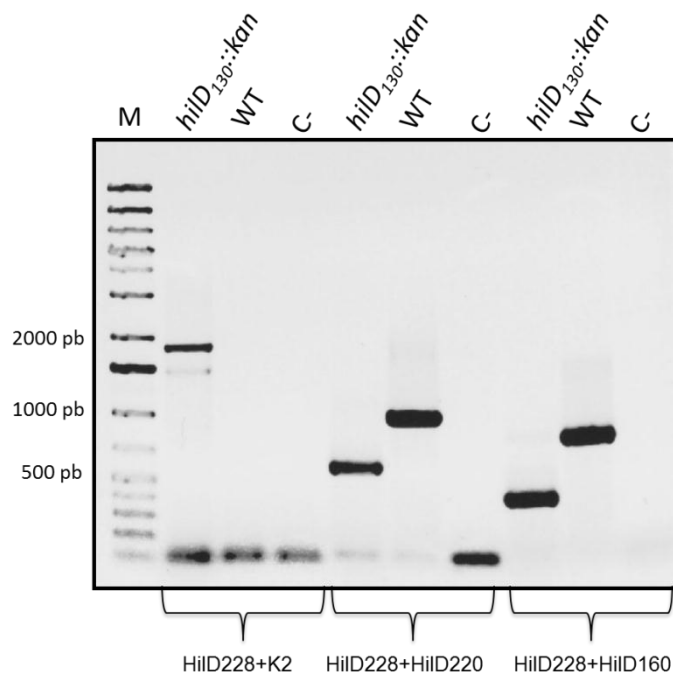


### $\Delta hilD_{130-309}::kan$



Figura 29. Representación esquemática de la construcción de la mutante  $\Delta hilD_{130-309}::kan$ .

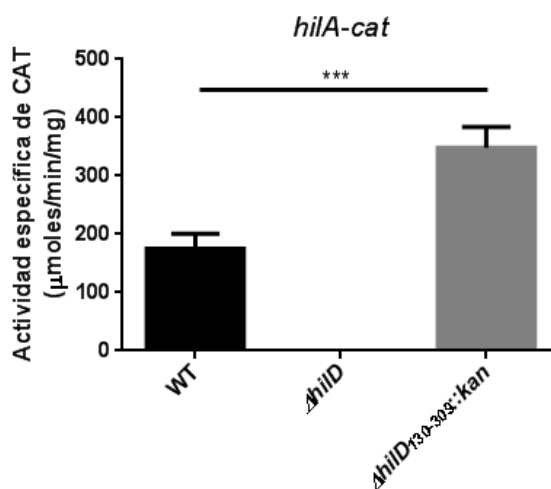
La cepa  $\Delta hilD_{130-309}::kan$  obtenida se verificó por PCR y secuenciación. Utilizando varias combinaciones de oligonucleótidos se confirmó el tamaño del gen insertado en el cromosoma, el cual carece de 387 pb con respecto al gen silvestre (figura 30). En la combinación de oligonucleótidos HilD228 + K2, que amplifica el gen más el casete de kanamicina, se observa un fragmento de aproximadamente 2000 pb, el cual está ausente en la cepa WT de *S. Typhimurium* debido a que carece del casete de kanamicina. Por otro lado, con las combinaciones de oligonucleótidos HilD228 + HilD220 y HilD228 + HilD160 se obtuvieron fragmentos de ~501 y 321 pb, respectivamente. Estos oligonucleótidos solo amplifican una parte de la secuencia del gen HilD sin incluir el casete de kanamicina. En conjunto, estos resultados indican que el gen insertado es de menor tamaño al gen silvestre y que está seguido del casete de resistencia a antibiótico, confirmando nuestra construcción.



**Figura 30. PCR para verificar la mutación  $\Delta hilD_{130-309}::kan$  en el cromosoma de *S. Typhimurium*.** Se muestran tres combinaciones de oligonucleótidos: HilD228-K2, producto esperado ~2000 pb. HilD228-HilD220, producto esperado ~501 pb. HilD228-HilD160, producto esperado ~321 pb.

Para determinar si la proteína HilD<sub>130-309</sub> expresada a partir de su propio promotor activa la expresión de sus genes blanco, se evaluó si inducía la expresión del gen *hila*. Para esto se transformó la mutante  $\Delta hilD_{130-309}::kan$  con el plásmido *phlA-cat1* y se cuantificó la expresión de la fusión *hila-cat*. Como control, se midió la actividad de *hila-cat* en la cepa WT de *S. Typhimurium* y en su derivada mutante  $\Delta hilD$ . En la mutante  $\Delta hilD_{130-309}::kan$  se indujo la expresión de la fusión *hila-cat*, incluso a niveles mayores que en la cepa WT de *S. Typhimurium*; en contraste, no se detectó expresión en la mutante  $\Delta hilD$  (figura 31). Estos resultados indican que la proteína HilD<sub>130-309</sub> puede activar la expresión de sus genes blanco.



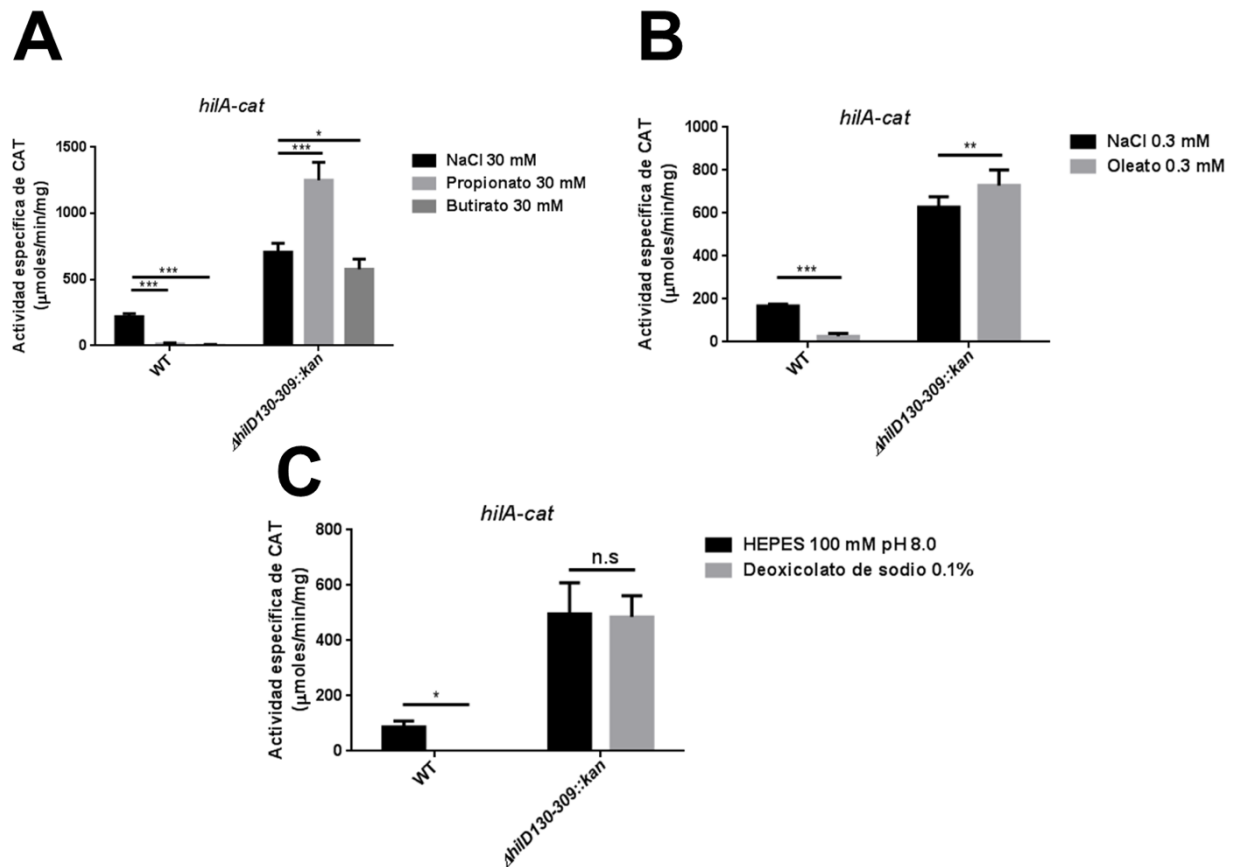


**Figura 31. La cepa de *S. Typhimurium*  $\Delta hilD_{130-309}::kan$  induce la expresión de *hilA*.** La expresión de la fusión *hilA-cat*, contenida en el plásmido *philA-cat1*, se determinó en *S. Typhimurium* WT y en sus derivadas mutantes  $\Delta hilD$  y  $\Delta hilD_{130-309}::kan$ . La actividad específica de CAT se determinó en cultivos crecidos en LB e incubados a 37°C. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras indican la desviación estándar, \*\*\* datos estadísticamente significativos comparados con la cepa WT ( $p < 0,05$ ).

Para investigar si la región N-terminal de HilD participa en la detección de señales, se evaluó el efecto de la presencia de ácidos grasos en la expresión de *hilA*, tanto en la cepa WT de *S. Typhimurium* que expresa a HilD silvestre, como en su derivada mutante  $\Delta hilD_{130-309}::kan$  que expresa a HilD<sub>130-309</sub>. Para descartar que el efecto en la expresión fuera causado por la osmolaridad del medio, la expresión de *hilA-cat* también fue probada en LB con NaCl a las mismas concentraciones que los ácidos grasos. Los experimentos fueron realizados en LB tamponado a pH 6.7 que corresponde con el pH reportado para la porción del intestino delgado donde tiene lugar la invasión por *Salmonella*, excepto para el ensayo con deoxicolato de sodio, el cual fue realizado a pH 8.0 debido a que su solubilidad aumenta a este pH, como se reportó previamente (Eade et al., 2016).

La presencia de los ácidos grasos de cadena corta, propionato y butirato, disminuyeron la expresión de *hilA-cat* en la cepa WT de *S. Typhimurium* pero no en la cepa mutante  $\Delta hilD_{130-309}::kan$ .

*309::kan* (figura 32A). Asimismo, el oleato, un ácido graso de cadena larga y el deoxicolato de sodio, una sal biliar presente en el intestino, disminuyeron la expresión de la fusión *hilA-cat* en la cepa WT pero no en la mutante  $\Delta hilD_{130-309}::kan$  (figura 32B y C). En conjunto, estos resultados indican que HilD detecta la presencia de estas moléculas inhibitorias por su región N-terminal, debido a que la cepa  $\Delta hilD_{130-309}::kan$  que expresa a la proteína HilD<sub>130-309</sub>, la cual carece de esta región, se vuelve resistente al efecto producido por los ácidos grasos y la sal biliar probada.



**Figura 32. La actividad de la proteína HilD<sub>130-309</sub> no es inhibida por el propionato, butirato, oleato ni deoxicolato de sodio.** La expresión de la fusión *hilA-cat*, contenida en el plásmido *philA-cat1*, se determinó en *S. Typhimurium* WT y en su derivada mutante  $\Delta hilD_{130-309}::kan$ , cultivadas en presencia de (A) propionato y butirato, (B) oleato o (C) deoxicolato de sodio. Como control de osmolaridad, las cepas también fueron cultivadas en presencia de NaCl. La actividad específica de CAT se determinó en cultivos crecidos en medio LB tamponado con MOPS 100 mM a pH 6.7 para los ácidos grasos propionato, butirato y oleato, o con HEPES 100 mM a pH 8.0 para el deoxicolato de sodio. Los cultivos fueron incubados a 37°C por 16 h en agitación. Las concentraciones de ácidos

grasos usadas están indicadas en la figura. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras indican la desviación estándar, \*\*\* datos estadísticamente significativos comparados con la cepa WT ( $p < 0,05$ ).

## 6. Discusión

El control de la expresión de los genes de virulencia constituye un aspecto importante para la patogénesis bacteriana porque permite su expresión en el tiempo y nicho adecuados. Además, contribuye a reducir el gasto energético en momentos donde la expresión de ciertos genes no es requerida. La expresión de los genes relacionados con el ensamble y funcionamiento del SST3 tiene un efecto negativo sobre la tasa de crecimiento de diversas bacterias patógenas, incluyendo *Salmonella* (Sturm et al., 2011). En *S. enterica*, la expresión de los genes del SST3-1 requerido para la invasión, es controlada por HilD, cuyo gen se encuentra codificado dentro de SPI-1. La expresión, concentración y actividad de HilD está altamente controlada por diversos reguladores. Previamente se demostró que HilE regula la actividad de HilD a través de la interacción proteína-proteína (Baxter et al., 2003). En este estudio, demostramos que HilE regula la actividad de HilD al inhibir su dimerización y su unión al DNA (figuras 15B y 17). En concordancia con nuestros resultados, un estudio reciente también demostró que HilE bloquea la unión de HilD al DNA (Grenz et al., 2018). Asimismo, demostramos que HilD requiere dimerizar para inducir la expresión de sus genes blanco (figura 13); consistentemente, los sitios de unión de HilD sobre el DNA de varios genes constan de dos secuencias repetidas directas, sugiriendo la unión de un dímero de HilD (Olekhnovich and Kadner, 2007; Schechter and Lee, 2001; Singer et al., 2014). Otros miembros de la familia AraC/Xyls, como ToxT, UreR, ExsA, AggR, que participan en la regulación de la expresión de genes de virulencia de *V. cholerae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, respectivamente, también dimerizan (Brutinel et al., 2009; Brutinel et al., 2010; Poore et al., 2001; Prouty et al., 2005; Santiago et al., 2016). HilE interacciona por la región central de HilD (figura 5B) e inhibe su dimerización y probablemente esto también afecte de manera indirecta, su unión al DNA. Adicionalmente, HilE interacciona con la región C-terminal de HilD, que

contiene el dominio de unión de DNA, inhibe su unión y afecta su actividad transcripcional de una manera independiente de la dimerización (figuras 5B, 16 y 17A). Esta regulación dual, demuestra el estricto control de la actividad de HilD. Se ha visto que AaR interacciona con la región N-terminal de AggR, un regulador de tipo AraC, que regula la expresión de genes relacionados con la adhesión de *E. coli* enteroagregativa, inhibiendo su dimerización y unión al DNA (Santiago et al., 2016). Asimismo, ExsA de *P.aeruginosa*, involucrado en el control de la expresión del SST3, es regulado negativamente por ExsD, a través de su interacción con la región N-terminal, inhibiendo su dimerización y unión al DNA (Brutinel et al., 2009; Brutinel et al., 2010; Thibault et al., 2009). Aunque el mecanismo de acción de estos reguladores negativos es similar a HilE, no se ha demostrado que Aar o ExsD unan la región C-terminal de sus proteínas blanco. Un ejemplo de una proteína que se une directamente al dominio de unión a DNA del regulador transcripcional es el control ejercido por CarS sobre el represor CarA de *Myxococcus xanthus*. CarS se une al dominio de unión a DNA de CarA e inhibe la interacción con sus genes blanco. De manera interesante, la estructura de CarS mimetiza al operador reconocido por CarA (Leon et al., 2010). Estudios adicionales como análisis de las estructuras tridimensionales, calorimetría y otros, son requeridos para conocer la relación estequiométrica exacta de la interacción entre HilD y HilE.

Por otro lado, se ha visto que la interacción proteína-proteína con reguladores negativos, puede afectar la estabilidad de ciertas proteínas. Por ejemplo, FliT interacciona con el complejo FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> (Yamamoto and Kutsukake, 2006), el regulador central de los genes del flagelo, e incrementa la degradación de la subunidad FlhC por la proteasa ClpXP (Sato et al., 2014). Nuestros resultados descartan el efecto negativo de HilE sobre la estabilidad de HilD, en las

condiciones de crecimiento probadas (figura 9), demostrando que Hile solo controla la actividad regulatoria de HilD y no su estabilidad.

De manera interesante, encontramos que Hile comparte ~30% de identidad con las secuencias de diversas proteínas Hcp de bacterias Gram negativas. Asimismo, las estructuras terciaria y cuaternaria modeladas de Hile son homólogas a la estructuras cristalográficas de estas proteínas (figura 18), por lo cual podríamos sugerir que Hile es una proteína similar a Hcp. Es importante mencionar que este grupo de proteínas aunque son muy similares estructuralmente, comparten poca identidad de secuencia (Mougous et al., 2006). Las proteínas Hcp son componentes estructurales del sistema de secreción tipo 6 (SST6), un sistema de translocación de efectores, compuesto por aproximadamente 13 proteínas que semeja a un fago invertido y que participa en diversas funciones incluyendo virulencia y actividad antibacteriana (Gallique et al., 2017; Records, 2011). Hcp es una proteína hexámerica que forma la estructura del nanotubo que permite la traslocación de las proteínas efectoras, desde el citoplasma de la bacteria a la célula presa o al medio extracelular. Además, tiene un papel como chaperona, que ayuda a la traslocación de la proteínas efectoras e incluso puede ser secretada a través de este sistema (Mougous et al., 2006; Records, 2011). Las proteínas del SST6 están relacionadas con proteínas de fagos; Hcp es homóloga a la proteína gp19 del fago T4 (Records, 2011). *S. enterica* tiene un SST6 funcional codificado en SPI-6 (Folkesson et al., 2002). A pesar de la similitud encontrada entre Hile y Hcp, se desconoce si Hile tiene alguna función estructural o de chaperona relacionada con el SST6 de *Salmonella*, lo cual queda por ser investigado.

Previamente, se reportó que el gen *hile* se encuentra codificado en una región del cromosoma que tiene características de isla genómica (Baxter et al., 2003). Análisis con BLASTp de las proteínas adyacentes a Hile, codificadas dentro de la misma isla genómica (figura 4), revelan que

no tienen homología con proteínas relacionadas con el SST6. Es posible especular que HilE podría provenir de una proteína Hcp del SST6, cuya función se adaptó durante la evolución de *Salmonella*, para actuar como un regulador de la expresión de los genes de virulencia.

HilD dimeriza e interacciona con HilE por su región central. El análisis de la mutagénesis *in silico* por alanina realizado con los modelos obtenidos del dímero de HilD y de la interacción con HilE revelaron varios aminoácidos probablemente involucrados en estas interacciones (tablas 4 y 5). Los aminoácidos sustituidos por alanina Y180A, F181A, F184A, L177A e I178A no tuvieron efecto sobre la dimerización de HilD (figura 24). Esto podría explicarse, debido a que probablemente la conformación obtenida en el modelo del dímero de HilD, no sea exactamente la que se encuentra en la naturaleza y por lo tanto las interacciones sugeridas por el análisis computacional no están involucradas en la dimerización. Por otro lado, las sustituciones por alanina de los aminoácidos Y180A, F181A, F184A de HilD, tuvieron un efecto parcial en su interacción con HilE (figura 26). Este hallazgo es muy importante, ya que definir los aminoácidos directamente involucrados en la interacción de HilD con su regulador negativo, constituye un blanco para el diseño de péptidos y/o compuestos que inhiban la actividad de HilD y en consecuencia la virulencia de *Salmonella*. Además, con estos resultados comprobamos experimentalmente, que los aminoácidos predichos de acuerdo a los modelos de interacción de HilD con HilE tienen un papel importante en la interacción de estas proteínas, sugiriendo que el modelo obtenido podría corresponder con la conformación real de las proteínas. Adicionalmente, resultados preliminares de sustituciones por alanina de aminoácidos de HilE, realizadas de acuerdo a los modelos, sugieren que estos están involucrados en su interacción con HilD, indicando nuevamente que el modelo probablemente corresponda con la estructura que se

encuentra en la naturaleza (datos no mostrados). Sin embargo, se requieren estudios de cristalografía para definir con precisión la estructura de estas proteínas.

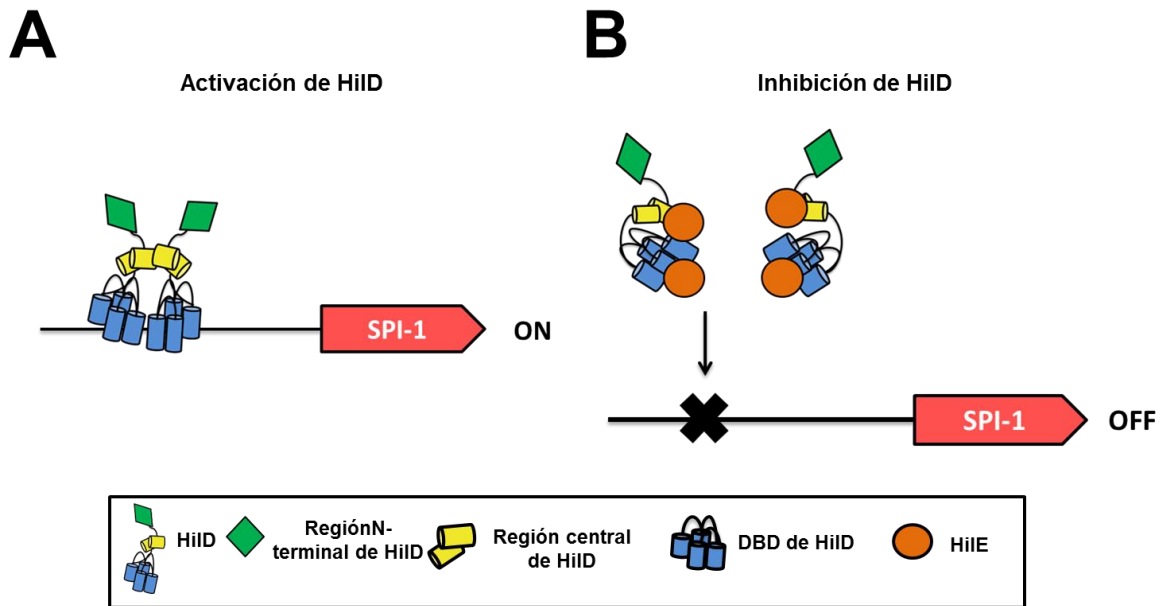
Los ácidos grasos y otros compuestos naturalmente encontrados a lo largo del tracto digestivo tienen efectos antibacterianos. Muchos de estos compuestos son derivados del metabolismo de la microbiota. Ácidos grasos de cadena corta como el acetato, propionato y butirato se han visto involucrados en la regulación de la expresión de genes de virulencia de diversas bacterias. Estos ácidos grasos incrementan la expresión de TcdB, la toxina producida por *Clostridium difficile*, el agente causal de la colitis pseudomembranosa en humanos (Hryckowian et al., 2018), modulan la expresión de los determinantes requeridos para el comensalismo y la virulencia de *Campylobacter jejuni*, un comensal intestinal de aves que puede ser transmitido a los humanos donde produce infección intestinal inflamatoria (Luethy et al., 2017). Por otro lado, se ha visto que estos y otros ácidos grasos pueden controlar directamente la actividad de reguladores transcripcionales de la familia AraC. El palmitato y el oleato inhiben la dimerización y unión de ToxT al DNA (Childers et al., 2011; Lowden et al., 2010). Asimismo, el ácido linoleico, presente en la bilis inhibe la unión de ToxT al DNA (Plecha and Withey, 2015). Aunque se ha reconocido la importancia de estos ácidos grasos sobre el control de la expresión de genes de virulencia, para la mayoría de los casos se desconoce si se unen directamente a las proteínas que regulan. En este estudio demostramos que la región N-terminal de HILD participa en la detección de moléculas inhibitorias, como propionato, butirato, oleato y deoxicolato de sodio (figura 32). La región N-terminal de las proteínas de la familia AraC ha sido asociada con el reconocimiento de señales de activación. Se ha visto que AraC y UreR unen por su región N-terminal arabinosa y urea, respectivamente (D'Orazio et al., 1996; Schleif, 2010). Sin embargo, solo para ToxT se demostró, mediante estudios de cristalografía, que une por su región N-terminal al ácido palmitoleico



(Lowden et al., 2010), el cual constituye una señal inhibitoria. Dilucidar el sitio de reconocimiento de señales en HilD será muy importante, debido a que se podrían diseñar compuestos que se unan a esta región e inhiban la actividad del regulador y por lo tanto la expresión de los genes de virulencia. Sin embargo, se requieren de estudios adicionales para comprobar si los ácidos grasos unen directamente la proteína HilD, así como definir los aminoácidos claves, involucrados en la detección de estas señales inhibitorias.

## 7. Conclusiones

1. En este estudio encontramos que HilD requiere dimerizar para activar la expresión de sus genes blanco.
2. El dominio de dimerización de HilD se encuentra localizado entre los aminoácidos 130 a 220, en la región central de la proteína.
3. HilD interacciona con HilE por su región central y C-terminal, que constituyen los sitios de dimerización y de unión al DNA de HilD, respectivamente.
4. HilE inhibe la dimerización y la unión de HilD al DNA.
5. Los aminoácidos Y180, F181 y F184 localizados en la región central de HilD son importantes para su interacción con HilE.
6. HilE es una proteína estructuralmente relacionada con las proteínas Hcp del SST6, que dimeriza y se sugiere podría formar hexámeros similares a los de Hcp.
7. Nuestros resultados sugieren que la región N-terminal de HilD está involucrada en la detección de moléculas que inhiben su actividad, como el propionato, butirato, oleato y deoxicolato de sodio, las cuales se encuentran naturalmente en el intestino y representan señales de localización que indican a las bacterias los nichos específicos de colonización.
8. Finalmente, proponemos un modelo en el cual la interacción dual de HilE con la región central y el dominio de unión a DNA de HilD inhibe la dimerización y la unión de HilD al DNA, respectivamente, afectando la capacidad de HilD de activar la expresión de sus genes blanco (figura 33).



**Figura 33. Modelo del mecanismo de regulación de HilD por HilE.** (A) HilD dimeriza por la región central, une al DNA a través de su dominio de unión a DNA (DBD) y activa la expresión de sus genes blanco. (B) HilE se une a la región central y al DBD de HilD, inhibiendo la dimerización y unión al DNA de HilD, respectivamente, lo que impide la posterior activación de la expresión de los genes blanco de HilD.

## 9. Perspectivas

- Obtener la estructura cristalográfica de HilD, HilE y del complejo HilD-HilE.
- Definir los aminoácidos involucrados en la dimerización de HilD.
- Definir los aminoácidos de HilE involucrados en la interacción con HilD.
- Demostrar la interacción de HilD con ácidos grasos.
- Definir el estado oligomérico de HilE.
- Definir si HilE tiene relación con el SST6 de *Salmonella*.

## 10.Referencias

- Ahmer, B. M., Gunn, J. S., 2011. Interaction of *Salmonella* spp. with the Intestinal Microbiota. *Front Microbiol.* 2, 101.
- Altier, C., Suyemoto, M., Lawhon, S. D., 2000. Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion genes by *csrA*. *Infect Immun.* 68, 6790-7.
- Antunes, L. C., McDonald, J. A., Schroeter, K., Carlucci, C., Ferreira, R. B., Wang, M., Yurist-Doutsch, S., Hira, G., Jacobson, K., Davies, J., Allen-Vercoe, E., Finlay, B. B., 2014. Antivirulence activity of the human gut metabolome. *MBio.* 5, e01183-14.
- Bajaj, V., Hwang, C., Lee, C. A., 1995. *hilA* is a novel ompR/toxR family member that activates the expression of *Salmonella* Typhimurium invasion genes. *Mol Microbiol.* 18, 715-27.
- Bakowski, M. A., Braun, V., Lam, G. Y., Yeung, T., Heo, W. D., 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, 453-62.
- 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.
- Baxter, M. A., Jones, B. D., 2005. The *fimYZ* genes regulate *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility. *Infect Immun.* 73, 1377-85.
- Baxter, M. A., Jones, B. D., 2015. Two-component regulators control *hilA* expression by controlling *fimZ* and *hilE* expression within *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* 83, 978-85.
- Boddicker, J. D., Jones, B. D., 2004. Lon protease activity causes down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells. *Infect. Immun.* 72, 2002-13.
- Boddicker, J. D., Knosp, B. M., Jones, B. D., 2003. Transcription of the *Salmonella* invasion gene activator, *hilA*, requires HilD activation in the absence of negative regulators. *J Bacteriol.* 185, 525-33.
- Brutinel, E. D., Vakulskas, C. A., Yahr, T. L., 2009. Functional domains of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *J. Bacteriol.* 191, 3811-21.
- Brutinel, E. D., Vakulskas, C. A., Yahr, T. L., 2010. ExsD inhibits expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by disrupting ExsA self-association and DNA binding activity. *J. Bacteriol.* 192, 1479-86.
- 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. U S A.* 105, 14591-6.
- Bustos, S. A., Schleif, R. F., 1993. Functional domains of the AraC protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90, 5638-42.
- Casadaban, M. J., 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol.* 104, 541-55.
- Colgan, A. M., Kroger, C., Diard, M., Hardt, W. D., Puente, J. L., Sivasankaran, S. K., Hokamp, K., Hinton, J. C., 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, e1006258.
- Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., Camacho, C. J., 2004. ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res.* 32, W96-9.
- Cordero-Alba, M., Ramos-Morales, F., 2014. Patterns of expression and translocation of the ubiquitin ligase SlrP in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 196, 3912-22.

- Chavez, R. G., Alvarez, A. F., Romeo, T., Georgellis, D., 2010. The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *J Bacteriol.* 192, 2009-12.
- Chilcott, G. S., Hughes, K. T., 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64, 694-708.
- Childers, B. M., Cao, X., Weber, G. G., Demeler, B., Hart, P. J., Klose, K. E., 2011. N-terminal residues of the *Vibrio cholerae* virulence regulatory protein ToxT involved in dimerization and modulation by fatty acids. *J Biol Chem.* 286, 28644-55.
- Chubiz, J. E., Golubeva, Y. A., Lin, D., Miller, L. D., Slauch, J. M., 2010. FlhZ regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion locus by controlling HilD protein activity in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 192, 6261-70.
- D'Orazio, S. E., Thomas, V., Collins, C. M., 1996. Activation of transcription at divergent urea-dependent promoters by the urease gene regulator UreR. *Mol Microbiol.* 21, 643-55.
- Daines, D. A., Silver, R. P., 2000. Evidence for multimerization of neu proteins involved in polysialic acid synthesis in *Escherichia coli* K1 using improved LexA-based vectors. *J. Bacteriol.* 182, 5267-70.
- Darwin, K. H., Miller, V. L., 2000. The putative invasion protein chaperone SicA acts together with InvF to activate the expression of *Salmonella* Typhimurium virulence genes. *Mol Microbiol.* 35, 949-60.
- 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.
- Dmitrova, M., Younes-Cauet, G., Oertel-Buchheit, P., Porte, D., Schnarr, M., Granger-Schnarr, M., 1998. A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 257, 205-12.
- Eade, C. R., Hung, C. C., Bullard, B., Gonzalez-Escobedo, G., Gunn, J. S., Altier, C., 2016. Bile Acids Function Synergistically to Repress Invasion Gene Expression in *Salmonella* by Destabilizing the Invasion Regulator HilD. *Infect. Immun.* 84, 2198-208.
- Eichelberg, K., Galan, J. E., 1999. Differential regulation of *Salmonella* Typhimurium type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-encoded transcriptional activators *InvF* and *hilA*. *Infect Immun.* 67, 4099-105.
- 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.
- Ellermeier, C. D., Slauch, J. M., 2003. RtsA and RtsB coordinately regulate expression of the invasion and flagellar genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* 185, 5096-108.
- Ellermeier, J. R., Slauch, J. M., 2008. Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. *J. Bacteriol.* 190, 476-86.
- Espinosa, E., Casadesus, J., 2014. Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 (SPI-1) by the LysR-type regulator LeuO. *Mol. Microbiol.* 91, 1057-69.
- Fabrega, A., Vila, J., 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 308-41.
- Fahlen, T. F., Mathur, N., Jones, B. D., 2000. Identification and characterization of mutants with increased expression of *hilA*, the invasion gene transcriptional activator of *Salmonella* Typhimurium. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 28, 25-35.
- Folkesson, A., Lofdahl, S., Normark, S., 2002. The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Res. Microbiol.* 153, 537-45.
- Fookes, M., Schroeder, G. N., Langridge, G. C., Blondel, C. J., Mammina, C., Connor, T. R., Seth-Smith, H., Vernikos, G. S., Robinson, K. S., Sanders, M., Petty, N. K., Kingsley, R. A., Baumler, A. J., Nuccio, S. P., Contreras, I., Santiviago, C. A., Maskell, D., Barrow, P., Humphrey, T., Nastasi, A.,

- Roberts, M., Frankel, G., Parkhill, J., Dougan, G., Thomson, N. R., 2011. *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the *Salmonellae*. PLoS Pathog. 7, e1002191.
- Gal-Mor, O., Finlay, B. B., 2006. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. Cell Microbiol. 8, 1707-19.
- Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., Ramos, J. L., 1997. Arac/XylS family of transcriptional regulators. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 393-410.
- Gallique, M., Bouteiller, M., Merieau, A., 2017. The Type VI Secretion System: A Dynamic System for Bacterial Communication? Front. Microbiol. 8, 1454.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., Hinton, J. C., Van Immerseel, F., 2006. Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. Appl. Environ. Microbiol. 72, 946-9.
- Garcia-del Portillo, F., Foster, J. W., Finlay, B. B., 1993. Role of acid tolerance response genes in *Salmonella* Typhimurium virulence. Infect Immun. 61, 4489-92.
- Gerlach, R. G., Holzer, S. U., Jackel, D., Hensel, M., 2007. Rapid engineering of bacterial reporter gene fusions by using Red recombination. Appl Environ Microbiol. 73, 4234-42.
- Golubeva, Y. A., Ellermeier, J. R., Cott Chubiz, J. E., Slauch, J. M., 2016. Intestinal Long-Chain Fatty Acids Act as a Direct Signal To Modulate Expression of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System. MBio. 7, e02170-15.
- Golubeva, Y. A., Sadik, A. Y., Ellermeier, J. R., Slauch, J. M., 2012. Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. Genetics. 190, 79-90.
- Gong, H., Vu, G. P., Bai, Y., Chan, E., Wu, R., Yang, E., Liu, F., Lu, S., 2011. A *Salmonella* small non-coding RNA facilitates bacterial invasion and intracellular replication by modulating the expression of virulence factors. PLoS. Pathog. 7, e1002120.
- 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.
- Hansen-Wester, I., Hensel, M., 2001. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. Microbes. Infect. 3, 549-59.
- Haraga, A., Ohlson, M. B., Miller, S. I., 2008. *Salmonellae* interplay with host cells. Nat. Rev. Microbiol. 6, 53-66.
- Hensel, M., 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. Int J Med Microbiol. 294, 95-102.
- Hoiseth, S. K., Stocker, B. A., 1981. Aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. Nature. 291, 238-9.
- Hryckowian, A. J., Van Treuren, W., Smits, S. A., Davis, N. M., Gardner, J. O., Bouley, D. M., Sonnenburg, J. L., 2018. Microbiota-accessible carbohydrates suppress *Clostridium difficile* infection in a murine model. Nat Microbiol. 3, 662-669.
- Huang, Y., Suyemoto, M., Garner, C. D., Cicconi, K. M., Altier, C., 2008. Formate acts as a diffusible signal to induce *Salmonella* invasion. J. Bacteriol. 190, 4233-41.
- 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, 225-33.
- Hung, C. C., Eade, C. R., Altier, C., 2016. The protein acyltransferase Pat post-transcriptionally controls HilD to repress *Salmonella* invasion. Mol Microbiol. 102, 121-36.
- Hung, C. C., Garner, C. D., Slauch, J. M., Dwyer, Z. W., Lawhon, S. D., Frye, J. G., McClelland, M., Ahmer, B. M., Altier, C., 2013. The intestinal fatty acid propionate inhibits *Salmonella* invasion through the post-translational control of HilD. Mol. Microbiol. 87, 1045-60.
- Husseiny, M. I., Hensel, M., 2005. Rapid method for the construction of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium vaccine carrier strains. Infect Immun. 73, 1598-605.

- Ibarra, J. A., Villalba, M. I., Puente, J. L., 2003. Identification of the DNA binding sites of PerA, the transcriptional activator of the *bfp* and *per* operons in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 185, 2835-47.
- Jacobson, A., Lam, L., Rajendram, M., Tamburini, F., Honeycutt, J., Pham, T., Van Treuren, W., Pruss, K., Stabler, S. R., Lugo, K., Bouley, D. M., Vilches-Moure, J. G., Smith, M., Sonnenburg, J. L., Bhatt, A. S., Huang, K. C., Monack, D., 2018. A Gut Commensal-Produced Metabolite Mediates Colonization Resistance to *Salmonella* Infection. *Cell Host Microbe.* 24, 296-307 e7.
- Jobichen, C., Chakraborty, S., Li, M., Zheng, J., Joseph, L., Mok, Y. K., Leung, K. Y., Sivaraman, J., 2010. Structural basis for the secretion of EvpC: a key type VI secretion system protein from *Edwardsiella tarda*. *PLoS. One.* 5, e12910.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., Ladant, D., 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95, 5752-6.
- Karimova, G., Ullmann, A., Ladant, D., 2000. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin as a tool to analyze molecular interactions in a bacterial two-hybrid system. *Int J Med Microbiol.* 290, 441-5.
- Kim, D. E., Chivian, D., Baker, D., 2004. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res.* 32, W526-31.
- Kroger, C., Colgan, A., Srikumar, S., Handler, K., Sivasankaran, S. K., Hammarlof, D. L., Canals, R., Grissom, J. E., Conway, T., Hokamp, K., Hinton, J. C., 2013. An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Cell Host Microbe.* 14, 683-95.
- Laughlin, R. C., Knodler, L. A., Barhoumi, R., Payne, H. R., Wu, J., Gomez, G., Pugh, R., Lawhon, S. D., Baumler, A. J., Steele-Mortimer, O., Adams, L. G., 2014. Spatial segregation of virulence gene expression during acute enteric infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *MBio.* 5, e00946-13.
- Lawhon, S. D., Maurer, R., Suyemoto, M., Altier, C., 2002. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella* Typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol. Microbiol.* 46, 1451-64.
- Leon, E., Navarro-Aviles, G., Santiveri, C. M., Flores-Flores, C., Rico, M., Gonzalez, C., Murillo, F. J., Elias-Arnanz, M., Jimenez, M. A., Padmanabhan, S., 2010. A bacterial antirepressor with SH3 domain topology mimics operator DNA in sequestering the repressor DNA recognition helix. *Nucleic. Acids. Res.* 38, 5226-41.
- Lim, S., Yun, J., Yoon, H., Park, C., Kim, B., Jeon, B., Kim, D., Ryu, S., 2007. Mlc regulation of *Salmonella* pathogenicity island I gene expression via *hile* repression. *Nucleic. Acids. Res.* 35, 1822-32.
- Lin, Q. P., Gao, Z. Q., Geng, Z., Zhang, H., Dong, Y. H., 2017. Crystal structure of the putative cytoplasmic protein STM0279 (Hcp2) from *Salmonella* Typhimurium. *Acta. Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.* 73, 463-468.
- Lowden, M. J., Skorupski, K., Pellegrini, M., Chiorazzo, M. G., Taylor, R. K., Kull, F. J., 2010. Structure of *Vibrio cholerae* ToxT reveals a mechanism for fatty acid regulation of virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 2860-5.
- Luethy, P. M., Huynh, S., Ribardo, D. A., Winter, S. E., Parker, C. T., Hendrixson, D. R., 2017. Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Modulate Expression of *Campylobacter jejuni* Determinants Required for Commensalism and Virulence. *MBio.* 8.
- Lundberg, U., Vinatzer, U., Berdnik, D., von Gabain, A., Baccarini, M., 1999. Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol.* 181, 3433-7.
- Main-Hester, K. L., Colpitts, K. M., Thomas, G. A., Fang, F. C., Libby, S. J., 2008. Coordinate regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* 76, 1024-35.
- Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G., Finlay, B. B., 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.* 2, 145-56.



- Martinez-Flores, I., Perez-Morales, D., Sanchez-Perez, 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, 37858.
- Martinez, L. C., Banda, M. M., Fernandez-Mora, M., Santana, F. J., Bustamante, V. H., 2014a. HilD Induces Expression of SPI-2 Genes by Displacing the Global Negative Regulator H-NS from *ssrAB*. *J. Bacteriol.* 196, 3746-55.
- Martinez, L. C., Martinez-Flores, I., Salgado, H., Fernandez-Mora, M., Medina-Rivera, A., Puente, J. L., Collado-Vides, J., Bustamante, V. H., 2014b. In silico identification and experimental characterization of regulatory elements controlling the expression of the *Salmonella csrB* and *csrC* genes. *J. Bacteriol.* 196, 325-36.
- Martinez, 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.
- Mayer, M. P., 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene.* 163, 41-6.
- Miao, E. A., Miller, S. I., 2000. A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella* Typhimurium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97, 7539-44.
- Moest, T. P., Meresse, S., 2013. *Salmonella* T3SSs: successful mission of the secret(ion) agents. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 38-44.
- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., Goodman, A. L., Joachimiak, G., Ordonez, C. L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A., Mekalanos, J. J., 2006. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science.* 312, 1526-30.
- 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, 6882-90.
- Parra, M. C., Collins, C. M., 2012. Mutational analysis of the N-terminal domain of UreR, the positive transcriptional regulator of urease gene expression. *Microbiol Res.* 167, 433-44.
- Peixoto, R. J. M., Alves, E. S., Wang, M., Ferreira, R. B. R., Granato, A., Han, J., Gill, H., Jacobson, K., Lobo, L. A., Domingues, R., Borchers, C. H., Davies, J. E., Finlay, B. B., Antunes, L. C. M., 2017. Repression of *Salmonella* host cell invasion by aromatic small molecules from the human fecal metabolome. *Appl Environ Microbiol.*
- Petrone, B. L., Stringer, A. M., Wade, J. T., 2014. Identification of HilD-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 196, 1094-101.
- Plecha, S. C., Withey, J. H., 2015. Mechanism for inhibition of *Vibrio cholerae* ToxT activity by the unsaturated fatty acid components of bile. *J. Bacteriol.* 197, 1716-25.
- Poore, C. A., Coker, C., Dattelbaum, J. D., Mobley, H. L., 2001. Identification of the domains of UreR, an AraC-like transcriptional regulator of the urease gene cluster in *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol.* 183, 4526-35.
- Prouty, M. G., Osorio, C. R., Klose, K. E., 2005. Characterization of functional domains of the *Vibrio cholerae* virulence regulator ToxT. *Mol. Microbiol.* 58, 1143-56.
- Que, F., Wu, S., Huang, R., 2013. *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) at work. *Curr Microbiol.* 66, 582-7.
- Records, A. R., 2011. The type VI secretion system: a multipurpose delivery system with a phage-like machinery. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 24, 751-7.
- Rivera-Chavez, F., Zhang, L. F., Faber, F., Lopez, C. A., Byndloss, M. X., Olsan, E. E., Xu, G., Velazquez, E. M., Lebrilla, C. B., Winter, S. E., Baumler, A. J., 2016. Depletion of Butyrate-Producing *Clostridia* from the Gut Microbiota Drives an Aerobic Luminal Expansion of *Salmonella*. *Cell Host Microbe.* 19, 443-54.

- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y., 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 5, 725-38.
- Ruiz, F. M., Santillana, E., Spinola-Amilibia, M., Torreira, E., Culebras, E., Romero, A., 2015. Crystal Structure of Hcp from *Acinetobacter baumannii*: A Component of the Type VI Secretion System. *PLoS. One.* 10, e0129691.
- Ruiz, R., Marques, S., Ramos, J. L., 2003. Leucines 193 and 194 at the N-terminal domain of the XylS protein, the positive transcriptional regulator of the TOL meta-cleavage pathway, are involved in dimerization. *J. Bacteriol.* 185, 3036-41.
- Sanchez-Vargas, F. M., Abu-El-Haija, M. A., Gomez-Duarte, O. G., 2011. *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel. Med. Infect. Dis.* 9, 263-77.
- Sang, Y., Ren, J., Ni, J., Tao, J., Lu, J., Yao, Y. F., 2016. Protein Acetylation Is Involved in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Virulence. *J. Infect. Dis.* 213, 1836-45.
- Santiago, A. E., Yan, M. B., Tran, M., Wright, N., Luzader, D. H., Kendall, M. M., Ruiz-Perez, F., Nataro, J. P., 2016. A large family of anti-activators accompanying XylS/AraC family regulatory proteins. *Mol. Microbiol.* 101, 314-32.
- Santos, R. L., 2014. Pathobiology of *Salmonella*, intestinal microbiota, and the host innate immune response. *Front Immunol.* 5, 252.
- Sato, Y., Takaya, A., Mouslim, C., Hughes, K. T., Yamamoto, T., 2014. FliT selectively enhances proteolysis of FlhC subunit in FlhD4C2 complex by an ATP-dependent protease, ClpXP. *J. Biol. Chem.* 289, 33001-11.
- 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, 1289-99.
- Schleif, R., 2010. AraC protein, regulation of the l-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 779-96.
- Singer, H. M., Kuhne, 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, 1448-57.
- Smith, C., Stringer, A. M., Mao, C., Palumbo, M. J., Wade, J. T., 2016. Mapping the Regulatory Network for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Invasion. *MBio.* 7, e01024-16.
- Soisson, S. M., MacDougall-Shackleton, B., Schleif, R., Wolberger, C., 1997. Structural basis for ligand-regulated oligomerization of AraC. *Science.* 276, 421-5.
- Sturm, A., Heinemann, M., Arnoldini, M., Benecke, A., Ackermann, M., Benz, M., Dormann, J., Hardt, W. D., 2011. The cost of virulence: retarded growth of *Salmonella* Typhimurium cells expressing type III secretion system 1. *PLoS. Pathog.* 7, e1002143.
- Takaya, A., Kubota, Y., Isogai, E., Yamamoto, T., 2005. Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads to downregulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Mol. Microbiol.* 55, 839-52.
- Thibault, J., Faudry, E., Ebel, C., Attree, I., Elsen, S., 2009. Anti-activator ExsD forms a 1:1 complex with ExsA to inhibit transcription of type III secretion operons. *J. Biol. Chem.* 284, 15762-70.
- Thiennimitr, P., Winter, S. E., Baumber, A. J., 2012. *Salmonella*, the host and its microbiota. *Curr Opin Microbiol.* 15, 108-14.
- Thijs, I. M., De Keersmaecker, S. C., 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, 4587-96.
- van der Velden, A. W., Baumber, A. J., Tsolis, R. M., Heffron, F., 1998. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium in mice. *Infect Immun.* 66, 2803-8.
- Van Immerseel, F., Boyen, F., Gantois, I., Timbermont, L., Bohez, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., 2005. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. *Poult. Sci.* 84, 1851-6.

- Van Immerseel, F., De Buck, J., De Smet, I., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., 2004. Interactions of butyric acid- and acetic acid-treated *Salmonella* with chicken primary cecal epithelial cells *in vitro*. *Avian Dis.* 48, 384-91.
- Yamamoto, S., Kutsukake, K., 2006. FliT acts as an anti-FlhD2C2 factor in the transcriptional control of the flagellar regulon in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* 188, 6703-8.

## **11.Anexo: artículo**

Artículo derivado de la presente tesis: **“The Hcp-like protein HilE inhibits homodimerization and DNA binding of the virulence-associated transcriptional regulator HilD in *Salmonella*”**



# The Hcp-like protein HilE inhibits homodimerization and DNA binding of the virulence-associated transcriptional regulator HilD in *Salmonella*

Received for publication, December 12, 2017, and in revised form, February 27, 2018. Published, Papers in Press, March 13, 2018, DOI 10.1074/jbc.RA117.001421

Claudia C. Paredes-Amaya<sup>†1</sup>, Gilberto Valdés-García<sup>§</sup>, Víctor R. Juárez-González<sup>§</sup>, Enrique Rudiño-Piñera<sup>§</sup>, and Víctor H. Bustamante<sup>†2</sup>

From the Departments of <sup>†</sup>Molecular Microbiology and <sup>§</sup>Molecular Medicine and Bioprocesses, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México

Edited by Chris Whitfield

HilD is an AraC-like transcriptional regulator that plays a central role in *Salmonella* virulence. HilD controls the expression of the genes within the *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) and of several genes located outside SPI-1, which are mainly required for *Salmonella* invasion of host cells. The expression, amount, and activity of HilD are tightly controlled by the activities of several factors. The HilE protein represses the expression of the SPI-1 genes through its interaction with HilD; however, the mechanism by which HilE affects HilD is unknown. In this study, we used genetic and biochemical assays revealing how HilE controls the transcriptional activity of HilD. We found that HilD needs to assemble in homodimers to induce expression of its target genes. Our results further indicated that HilE individually interacts with each the central and the C-terminal HilD regions, mediating dimerization and DNA binding, respectively. We also observed that these interactions consistently inhibit HilD dimerization and DNA binding. Interestingly, a computational analysis revealed that HilE shares sequence and structural similarities with Hcp proteins, which act as structural components of type 6 secretion systems in Gram-negative bacteria. In conclusion, our results uncover the molecular mechanism by which the Hcp-like protein HilE controls dimerization and DNA binding of the virulence-promoting transcriptional regulator HilD. Our findings may indicate that HilE's activity represents a functional adaptation during the evolution of *Salmonella* pathogenicity.

The genus *Salmonella* groups pathogenic bacteria for human and many animals; it comprises only two species, *Salmonella*

This work was supported by Grant 254531 (to V. H. B.) and Predoctoral Fellowship 290934 (to C. C. P.-A.) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant IN203415 (to V. H. B.) and a postdoctoral fellowship (to G. V.-G.) from Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México, and funds from the Posgrado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México (to C. C. P.-A.). The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

This article contains Tables S1 and S2 and Figs. S1 and S2.

<sup>1</sup> This paper is completed as partial fulfillment of the requirements for a doctoral degree from the Posgrado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed: Dept. de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México. Tel.: 52-777-329-1627; Fax: 52-777-313-8673; E-mail: victor@ibt.unam.mx.

*enterica* and *Salmonella bongori*, the former is further divided into six subspecies and more than 2500 serovars. Depending on the host, *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) can cause diseases ranging from gastroenteritis to life-threatening systemic infection (1, 2). For instance, in humans, calves, and chickens, *S. Typhimurium* causes self-limiting gastroenteritis, whereas in laboratory mice, it causes a systemic infection resembling that produced by *S. Typhi* in humans; thus, *S. Typhimurium* is frequently used as a model to study the molecular mechanisms mediating the *Salmonella* virulence (1, 3, 4). Horizontal gene transfer events have greatly contributed to the evolution of the *Salmonella* pathogenicity (5, 6). Most of the genes gained by *Salmonella* are clustered in chromosomal regions called *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs)<sup>3</sup> (4, 5). SPI-1 is a 40-kb region conserved in the two *Salmonella* species, which includes 39 genes encoding a type 3 secretion system (T3SS-1), their chaperones and effector proteins, as well as some transcriptional regulators that control the expression of many virulence genes located within and outside SPI-1 (4, 7). The T3SSs are molecular syringes that extend from the membranes of several bacteria, composed of a basal body and a needle-like complex, through which effector proteins are injected from the bacterial cytoplasm into the cytoplasm of eukaryotic cells (8). *Salmonella* injects the SPI-1 effector proteins into the intestinal epithelial cells through the T3SS-1, which induces cytoskeletal rearrangements promoting the *Salmonella* invasion of these eukaryotic cells leading to enteritis (1, 4, 8).

The expression of the SPI-1 genes is controlled by several environmental clues, such as osmolarity, oxygen tension, pH, short- and long-fatty acid concentration, and bile (4, 9–11). *In vitro*, expression of the SPI-1 genes is induced at early stationary phase when *Salmonella* is grown in the nutrient-rich lysogenic broth (LB) (12, 13). Several regulators control the expression of the SPI-1 genes, including HilD, HilA, and InvF, all encoded in SPI-1, which act in a cascade fashion: HilD, a mem-

<sup>3</sup> The abbreviations used are: SPIs, *Salmonella* pathogenicity islands; SPI-1, *Salmonella* pathogenicity island 1; T3SS, type 3 secretion system; T6SS, type 6 secretion system; LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA DNA-binding domain wildtype; LexA<sub>DBDmut</sub>, LexA DNA-binding domain mutated; MBP, maltose-binding protein; Trx, thioredoxin; LZ, leucine zipper; Hcp, hemolysin-coregulated protein; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; LB, lysogenic broth; Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; EMSA, electrophoretic mobility assay; IPTG, isopropyl β-D-thiogalactopyranoside; β-gal, β-galactosidase; PDB, Protein Data Bank.

## HilE controls dimerization and DNA binding of HilD

ber of the AraC/XylS transcriptional regulators family, directly induces the expression of HilA, which in turn activates the expression of InvF; HilA and InvF activate the expression of all components of the T3SS-1, their chaperones, and effector proteins (4, 14). HilD induces the expression of HilA directly or through a positive feed-forward loop that it forms with HilC and RtsA (15, 16). HilC and RtsA are AraC-like transcriptional regulators that bind the same DNA sequence recognized by HilD; HilC is encoded within SPI-1, whereas RtsA is encoded in another island. HilD also controls the expression of many other virulence genes located outside SPI-1, including acquired and ancestral genes, directly, or indirectly through HilA, InvF, or other regulators (12, 17–25). In agreement with its role as a master transcriptional regulator for a high number of genes, the expression, concentration, and activity of HilD is tightly controlled. Transcription of *hilD* is positively autoregulated (15, 26) and is repressed by H-NS (27), whereas its translation is repressed by CsrA (28). In addition, Fur and FlhZ control HilD at post-translational level (29, 30); the Lon protease degrades HilD, thus mediating its concentration (31, 32); and the CpxR/A two-component system decreases the stability of HilD through Lon-dependent and independent mechanisms (33). Furthermore, several compounds affect HilD: propionate and bile salts decrease its stability (9, 10); butyrate and oleate negatively affect its regulatory activity, whereas acetate and formate enhance this (11, 34–36); and L-arabinose affects HilD expression at post-transcriptional level (37).

The activity of HilD is also negatively controlled by HilE through protein–protein interaction (38). However, the specific effect of this interaction on HilD has remained unknown. The *hilE* gene resides in a region of the *Salmonella* chromosome similar to a pathogenicity island (38), supporting that it was acquired by horizontal transfer. The expression of *hilE* is positively regulated by the PhoPQ and PhoBR two-component systems, as well as by FimZ and LeuO (39, 40), whereas this is negatively regulated by Mlc and the small RNA IsmR (41, 42), which provides additional inputs controlling the activity of HilD.

Here we show that HilE negatively affects dimerization and DNA binding of HilD, by interacting with both the central and C-terminal regions of HilD, which mediate dimerization and DNA binding, respectively. Therefore, our results demonstrate how HilE regulates HilD activity. Additionally, our results revealed that HilE shares sequence and structural similarities with proteins called Hcp (hemolysin-coregulated protein), which are structural components of type 6 secretion systems in Gram-negative bacteria, supporting the hypothesis that HilE was adapted to act as an important regulatory protein during the *Salmonella* pathogenicity evolution.

## Results

### HilE interacts with the central region and with the C-terminal region of HilD

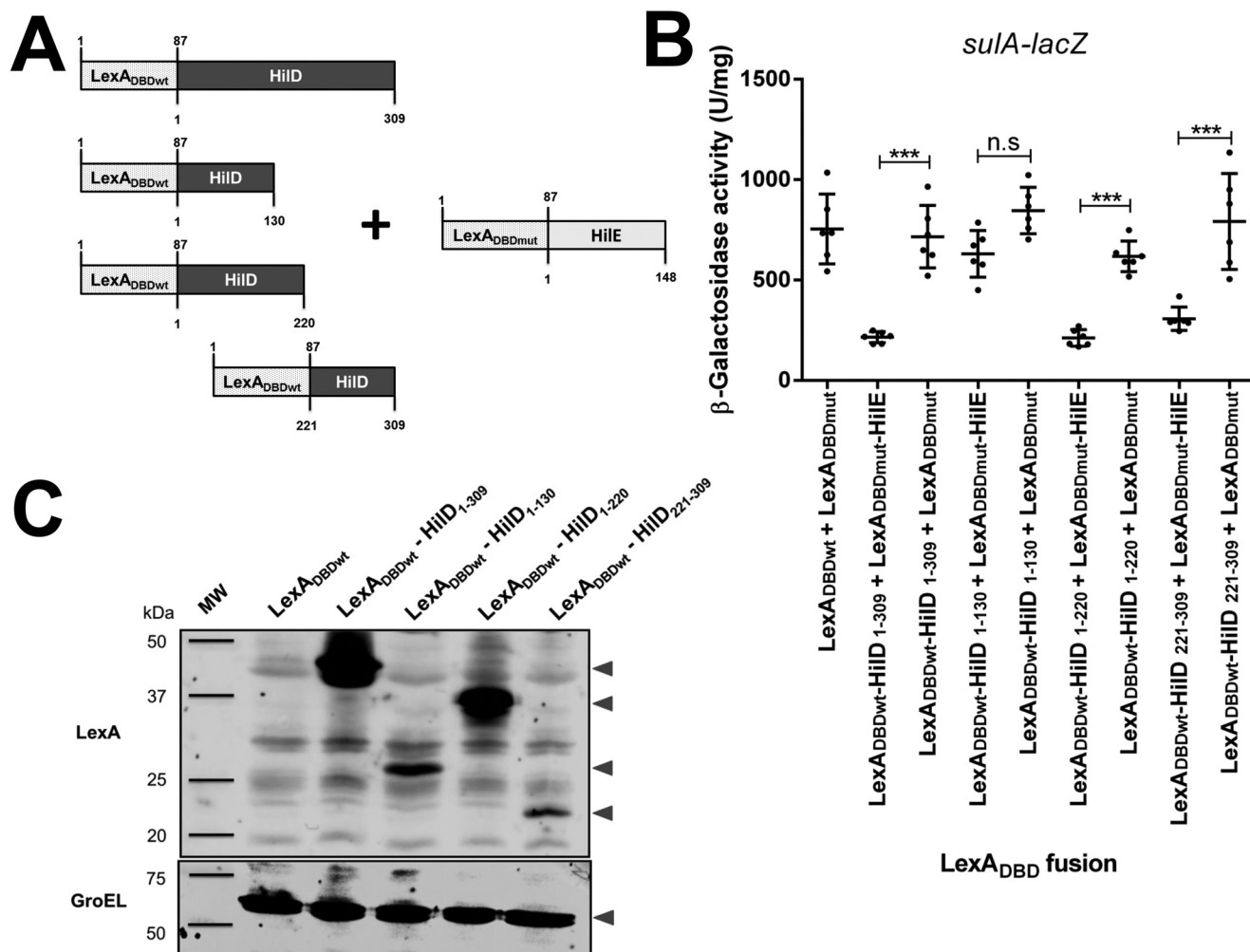
To investigate how HilE negatively affects the activity of HilD, we analyzed the interaction of HilE with different regions of HilD by using the LexA-based genetic system for heterodimerization, which is similar to a two-hybrid system to

analyze protein–protein interactions (43, 44). It is important to remark that the interaction between HilE and HilD was previously demonstrated with this system (38). In the LexA-based genetic system for heterodimerization, the WT LexA DNA-binding domain (LexA<sub>DBDwt</sub>) and a derivative mutant of this (LexA<sub>DBDmut</sub>) are expressed from two different plasmids in the *Escherichia coli* SU202 reporter strain, which carries a chromosomal *sula*–*lacZ* transcriptional fusion containing a LexA hybrid operator (43, 44). LexA<sub>DBDwt</sub> and LexA<sub>DBDmut</sub> cannot affect the expression of *sula*–*lacZ*; however, when they are fused to proteins that interact between them, an active dimer of LexA<sub>DBDwt</sub> and LexA<sub>DBDmut</sub> is formed that is able to bind the hybrid LexA operator on *sula*–*lacZ* and thus to repress the expression of this fusion. Fusion proteins of LexA<sub>DBDwt</sub> with full-length or distinct regions of HilD and of LexA<sub>DBDmut</sub> with full-length HilE were generated and assessed. The LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD fusions were named according to the amino acid position for the ends of the HilD fragment carried (Fig. 1A). As expected, the combination LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>1–309</sub> (full-length HilD) + LexA<sub>DBDmut</sub>–HilE (full-length HilE), but not LexA<sub>DBDwt</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub> or LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD + LexA<sub>DBDmut</sub>, mediated repression of *sula*–*lacZ* (Fig. 1B), further confirming the interaction between HilD and HilE. Interestingly, the fusion proteins LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>1–220</sub> or LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>221–309</sub>, in combination with LexA<sub>DBDmut</sub>–HilE, also repressed the expression of *sula*–*lacZ* (Fig. 1B), indicating that HilE interacts with the regions of HilD spanning amino acids 1–220 and 221–309. In contrast, the combination LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>1–130</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>–HilE did not repress the expression of *sula*–*lacZ*, supporting that HilE does not interact with the N-terminal region of HilD from amino acids 1 to 130. However, the lack of interaction between LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>1–130</sub> and LexA<sub>DBDmut</sub>–HilE could be due to an incorrect folding of LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>1–130</sub>. As expected, the combination LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>1–130</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>1–220</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub>, or LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>221–309</sub> + LexA<sub>DBDmut</sub> used as a negative control, did not affect the expression of *sula*–*lacZ* (Fig. 1B). Western blotting analysis showed expression signals for all the LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD fusion proteins tested (Fig. 1C). To note, the LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>221–309</sub> fusion repressed the *sula*–*lacZ* fusion, in combination with LexA<sub>DBDmut</sub>–HilE (Fig. 1B), even when its expression level was lower than that of the LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>1–309</sub> and LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>1–220</sub> fusions (Fig. 1C), indicating that differences in the amount of the LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD fusion proteins assessed did not affect the results of these assays. In agreement with a previous report (45), expression of LexA<sub>DBD</sub> was not detected in our Western blotting analysis (Fig. 1C). These results support that HilE interacts with regions spanning amino acids 130–220 and 221–309 of HilD.

Pulldown assays were performed to confirm the HilE interactions with HilD. For this, we purified HilE fused to the Trx protein and a His<sub>6</sub> tag (Trx–His–HilE) as described under “Experimental procedures.” The Trx–His–HilE fusion protein repressed the SPI-1-mediated protein secretion profile of the WT *S. Typhimurium* strain (Fig. 2A), which supports that it is able to negatively affect HilD. Trx–His–HilE was used as the bait protein in the pulldown assays; first, it was immobilized on Ni–NTA resin, and then whole-cell extracts containing



## HilE controls dimerization and DNA binding of HilD



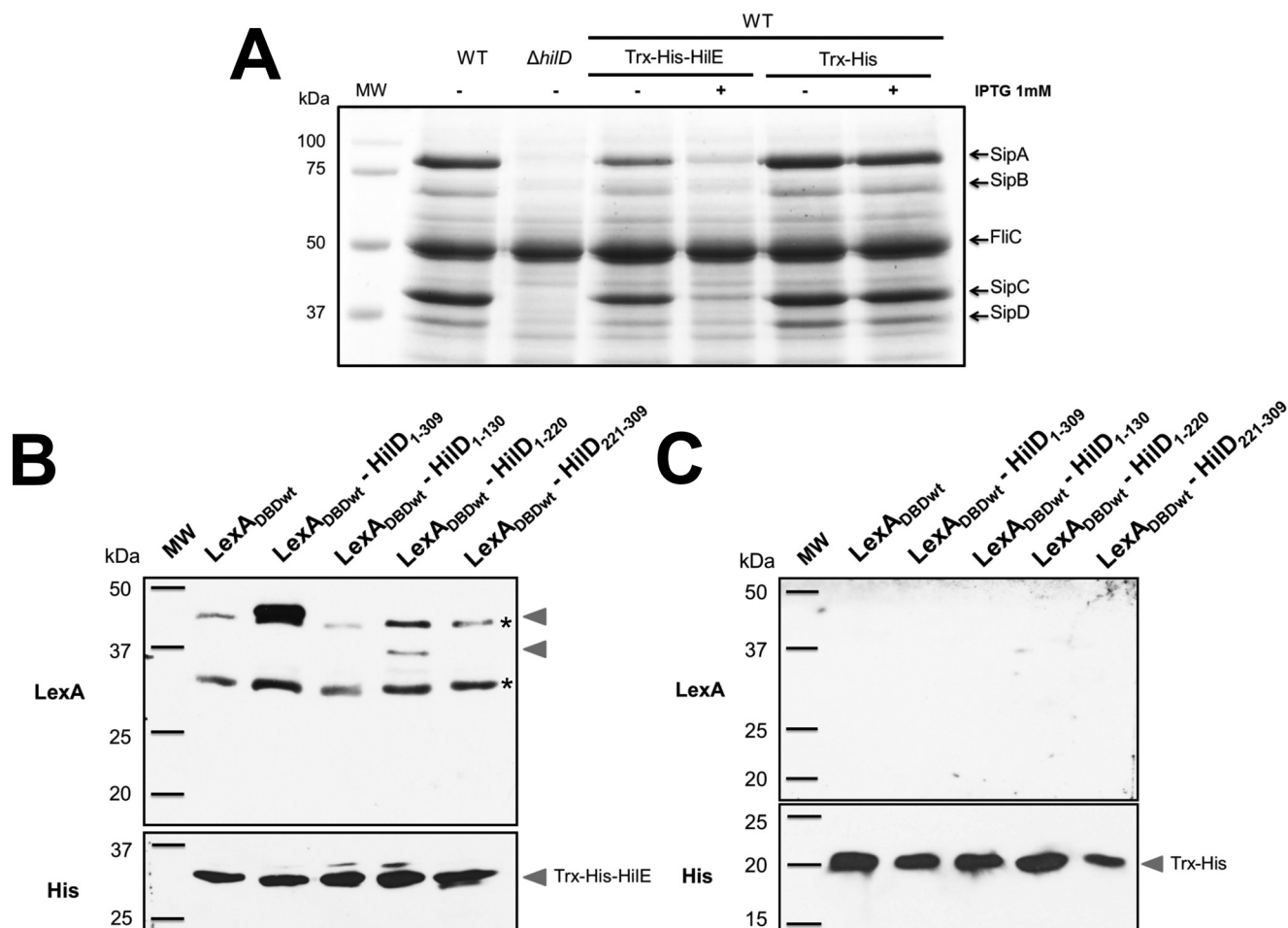
**Figure 1. HilE interacts with two different regions of HilD.** *A*, schematic representation of the LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD and LexA<sub>DBD</sub>mut-HilE fusion proteins tested. The numbers indicate the residues of LexA<sub>DBD</sub>, HilD, or HilE carried in the respective fusion protein. *B*, expression of the *sulA-lacZ* fusion was determined in the *E. coli* SU202 reporter strain containing the pair of plasmids pSR658 and pSR659 (LexA<sub>DBD</sub>wt + LexA<sub>DBD</sub>mut), pSR658-HilD1 and pSR659-HilE1 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-309</sub> + LexA<sub>DBD</sub>mut-HilE), pSR658-HilD2 and pSR659-HilE1 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-130</sub> + LexA<sub>DBD</sub>mut-HilE), pSR658-HilD4 and pSR659-HilE1 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-220</sub> + LexA<sub>DBD</sub>mut-HilE), pSR658-HilD5 and pSR659-HilE1 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>221-309</sub> + LexA<sub>DBD</sub>mut-HilE), or pSR658-HilD1 and pSR659-HilE1 (LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-309</sub> + LexA<sub>DBD</sub>mut). The β-gal activity was determined from samples collected of bacterial cultures grown in LB at 37 °C up to an A<sub>600</sub> of 1.0. Expression of the LexA<sub>DBD</sub> fusion proteins was induced by adding 1 mM IPTG to the medium. The data are the averages of three independent experiments performed in duplicate. The bars represent the standard deviations. \*\*\*, expression statistically significantly different compared with that reached in the absence of HilE ( $p < 0.001$ ); n.s., no significant difference. *C*, expression of the LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD, LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-130</sub>, LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-220</sub>, and LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>221-309</sub> proteins was analyzed by Western blotting using polyclonal anti-LexA antibodies. Whole cell lysates were prepared from samples of bacterial cultures grown in LB at 37 °C up to an A<sub>600</sub> of 1.0. As a loading control, the expression of GroEL was also determined using polyclonal anti-GroEL antibodies. MW, protein molecular weight standards (Precision Plus Protein™; Bio-Rad). The arrowheads indicate the expected bands.

either LexA<sub>DBD</sub> or LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-130</sub>, LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-220</sub>, LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>221-309</sub> prey proteins were loaded to the Ni-NTA resin carrying Trx-His-HilE. As expected, Trx-His-HilE captured the LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-309</sub> and LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-220</sub> prey proteins, but not LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>1-130</sub> or LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>221-309</sub> (Fig. 2B), confirming the interaction of HilE with full-length HilD and the central region of HilD. LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>221-309</sub> showed interaction with HilE in the LexA-based genetic system (Fig. 1B); however, in the pull-down assays, this interaction was no evident (Fig. 2B), which could be explained by the low level of expression showed by LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD<sub>221-309</sub> (Fig. 1C). As a control, parallel pull-down assays were performed using Trx-His as the bait protein, which was unable to capture any of the LexA<sub>DBD</sub>wt-HilD prey proteins tested (Fig. 2C). Taken together, these results indicate

that HilE binds to both the central region and the C-terminal region of HilD.

### HilE does not affect the stability of HilD

The interaction with HilE could affect the stability of HilD to investigate this, we determined the *in vivo* half-life of HilD in presence or absence of HilE or the Lon protease, which degrades HilD. The cellular levels of Myc-tagged HilD (HilD-Myc) expressed from the pBAD-HilD plasmid, under an arabinose-inducible promoter, were monitored in the *S. Typhimurium*  $\Delta$ *hilD*,  $\Delta$ *hilD*  $\Delta$ *hilE*, and  $\Delta$ *hilD*  $\Delta$ *lon* mutants, at different times after adding a mix of transcription and translation inhibitors. The levels of HilD-Myc were similar over time in the  $\Delta$ *hilD* and  $\Delta$ *hilD*  $\Delta$ *hilE* mutants, showing a half-life of HilD-Myc of 12.60 and 11.68 min, respectively; as expected, the sta-



**Figure 2. Pulldown assays showing the interaction between HilE and HilD.** A, secretion of the SPI-1-encoded proteins SipA, SipB, SipC, and SipD was tested in the WT *S. Typhimurium* strain and its isogenic  $\Delta$ *hilD* mutant, as well as in the WT *S. Typhimurium* strain carrying the pET32-HilE plasmid expressing Trx-His-HilE or the pET32b(+) vector expressing Trx-His. The bacterial cultures were grown for 9 h in LB at 37 °C, in the presence (+) or absence (–) of 1 mM IPTG to induce or not the expression of Trx-His-HilE or Trx-His. Supernatants of the cultures were analyzed in SDS-PAGE at 12%. FliC is a flagellar protein whose secretion is SPI-1-independent. B and C, bait proteins Trx-His-HilE (B) or Trx-His (C) immobilized on Ni-NTA resin were incubated with whole-cell extracts containing the LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-130</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub>, or LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub> prey proteins. After washing, the proteins captured by the Trx-His-HilE or Trx-His bait proteins were analyzed by Western blotting using polyclonal anti-LexA antibodies. The Trx-His-HilE or Trx-His bait proteins were also detected with monoclonal anti-His<sub>6</sub> antibodies. MW, protein molecular weight standards (Precision Plus Protein™; Bio-Rad). The arrowheads indicate the expected bands. Asterisks indicate bands showing cross-reaction with the polyclonal anti-LexA antibodies.

bility of HilD–Myc was drastically increased in the  $\Delta$ *hilD*  $\Delta$ lon mutant (Fig. 3, A and B). These results demonstrate that the interaction with HilE does not affect the stability of HilD.

#### HilD acts as a dimer, and its central region mediates the interaction itself

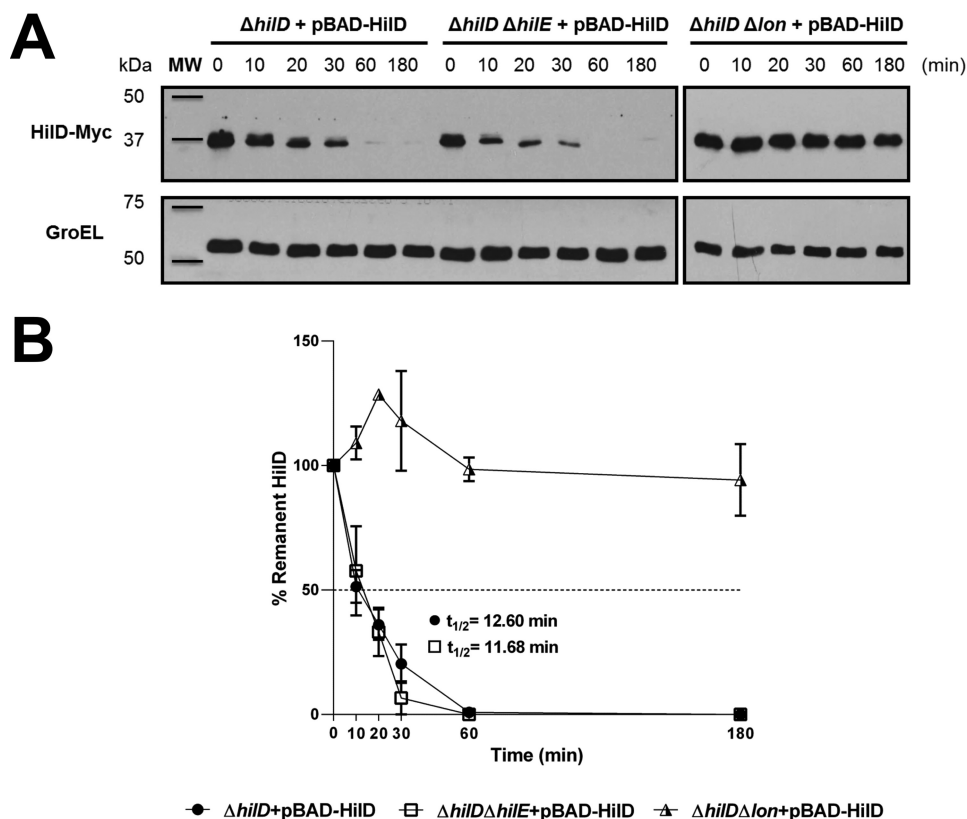
Several AraC-like transcriptional regulators act as dimers (46–49). Therefore, we thought that the interaction of HilE with the central region of HilD could affect dimerization of HilD. To investigate this possibility, we first analyzed whether HilD indeed dimerizes by using the LexA-based genetic system for homodimerization (43, 44). In this case, LexA<sub>DBDwt</sub> is expressed from a plasmid in the *E. coli* SU101 reporter strain, which carries a chromosomal *sulA-lacZ* transcriptional fusion containing the LexA WT operator (43, 44). LexA<sub>DBDwt</sub> does not affect the expression of *sulA-lacZ*; however, when it is fused to a protein that itself interacts, an active dimer of LexA<sub>DBDwt</sub> is formed, which is able to bind the WT LexA operator on *sulA-lacZ* and thus represses the expression of this fusion. The

same LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD fusion proteins used before in the heterodimerization assay were now tested in the homodimerization assay. LexA<sub>DBDwt</sub> alone and the fusion protein LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS, whose dimerization capacity has been tested before (50), were used as negative and positive controls, respectively. Both LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS and LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, but not LexA<sub>DBDwt</sub>, repressed the expression of *sulA-lacZ* (Fig. 4A), indicating that HilD dimerizes. A Western blotting analysis showed expression signals for the LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> and LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS fusion proteins (Fig. 4B). To confirm the dimerization of HilD, the size of the maltose-binding protein (MBP)-HilD fusion, purified in native conditions, was analyzed by gel-filtration chromatography. The MBP-HilD fusion protein eluted from the gel-filtration chromatography as a ~178-kDa product (Fig. S1), which corresponds to a size similar to that expected for a dimer of this protein.

LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub> also repressed the expression of *sulA-lacZ* (Fig. 4C), indicating that the region spanning amino acids 1–220 mediates the dimerization of HilD. In contrast,



## HilE controls dimerization and DNA binding of HilD

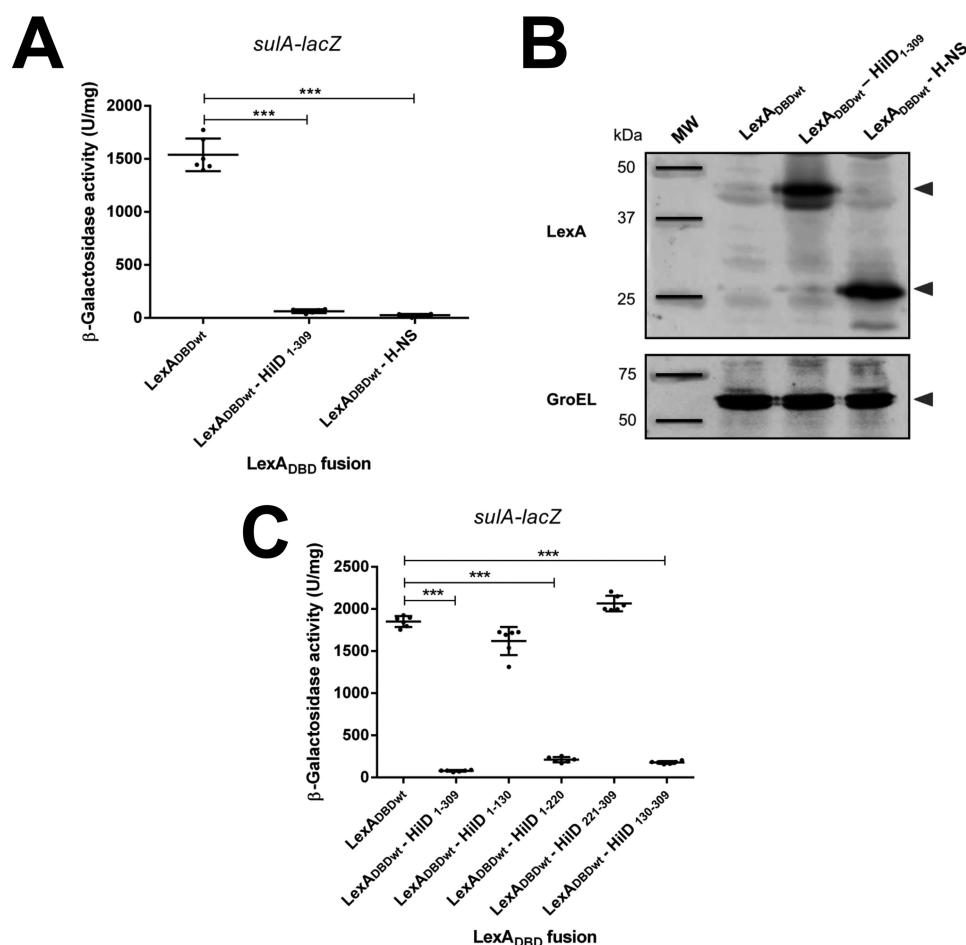


**Figure 3. HilE does not affect the stability of HilD.** A, stability of HilD–Myc was determined in the  $\Delta hilD$ ,  $\Delta hilD \Delta hilE$ , and  $\Delta hilD \Delta lon$  mutants of *S. Typhimurium* carrying the pBAD–HilD1 plasmid, grown in LB at 37 °C. Expression of HilD–Myc, from the arabinose-inducible promoter of pBAD–HilD1, was induced with 0.05% L-arabinose for 45 min; then transcription and translation were halted by the addition of a mixture of antibiotics and glucose, and samples of bacterial cultures were taken at the indicated times. HilD–Myc was detected from whole-cell lysates of the samples by Western blotting using monoclonal anti-Myc antibodies. As a loading control, the expression of GroEL was also determined using polyclonal anti-GroEL antibodies. A representative Western blotting of three independent experiments is shown. The figure is composed by four different blots. B, densitometric analysis of the HilD–Myc bands from the Western blotting is indicated as the relative percentage of HilD–Myc at each time with respect to time 0. Intensity values of HilD–Myc bands were normalized with those respective of GroEL bands. The data are the averages of three independent experiments. The bars represent the standard deviation, and  $t_{1/2}$  indicates the half-life of HilD. MW, protein molecular weight standards (Precision Plus Protein™; Bio-Rad).

LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>1–130</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>221–309</sub>, and the negative control LexA<sub>DBDwt</sub> did not affect the expression of *sula*–*lacZ* (Fig. 4C), supporting that the regions between amino acids 1 and 130 and amino acids 221 and 309 are not involved in the dimerization of HilD. These results suggest that the dimerization of HilD seems to be mediated by the region comprising amino acids 130–220. To further investigate this asseveration, we constructed and tested the LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>130–309</sub> fusion protein, containing an extended N-terminal HilD region with respect to LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>221–309</sub>. As could be expected, LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>130–309</sub> was able to represses the expression of *sula*–*lacZ* (Fig. 4C), indicating that it interacts itself. Together, these results indicate that HilD dimerizes through its central region ranging from amino acids 130 to 220.

Next, we sought to determine whether dimerization is required for the regulatory activity of HilD. For this, the ability to induce the expression of a *hila*–*cat* transcriptional fusion of LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>1–309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>221–309</sub>, and LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>130–309</sub>, which carry the DNA-binding domain of HilD, was tested in an *E. coli* K-12 strain. Because *hila* is a gene directly and positively controlled by HilD (4, 51) and HilD is not present in *E. coli* K-12. As a negative control, LexA<sub>DBDwt</sub> was also assessed; additionally, as a reference for the expression of *hila*–*cat* in the presence or absence of HilD, the

activity of this fusion was also determined in the WT *S. Typhimurium* strain and its isogenic  $\Delta hilD$  mutant. The expression of *hila*–*cat* was induced in the presence of LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>1–309</sub> or LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>130–309</sub>, which show dimerization, but it was not induced by LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>221–309</sub> that does not dimerize (Fig. 5). As expected, the expression of *hila*–*cat* was also induced in the WT *S. Typhimurium* strain, but not in the  $\Delta hilD$  mutant or in the presence of LexA<sub>DBDwt</sub> (Fig. 5). These results support that HilD needs to form dimers to induce the expression of target genes. To confirm this, we generated and analyzed the chimeric protein LexA<sub>DBDwt</sub>–LZ–HilD<sub>221–309</sub>, which is a fusion of LexA<sub>DBDwt</sub>, the leucine zipper (LZ) motif of the GCN4 transcriptional factor of *Saccharomyces cerevisiae*, and the DNA-binding domain of HilD (amino acids 221–309) (Fig. 6A). The LZ motif has been used before as a dimerization module (52). The ability of the LexA<sub>DBDwt</sub>–LZ–HilD<sub>221–309</sub> fusion protein to undergo dimerization and to induce the expression of *hila* was assessed and compared with that of the LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>221–309</sub> and LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>1–309</sub> fusion proteins. Both LexA<sub>DBDwt</sub>–LZ–HilD<sub>221–309</sub> and LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>1–309</sub>, but not LexA<sub>DBDwt</sub>–HilD<sub>221–309</sub>, repressed the expression of *sula*–*lacZ* in the *E. coli* SU101 reporter strain (Fig. 6B), indicating that LexA<sub>DBDwt</sub>–LZ–HilD<sub>221–309</sub> dimerizes through the heterologous LZ motif. Notably, LexA<sub>DBDwt</sub>–LZ–



**Figure 4. HilD forms homodimers through its central region.** *A*, expression of the *sula-lacZ* fusion was determined in the *E. coli* SU101 reporter strain containing the plasmids pSR658 (LexA<sub>DBDwt</sub>), pSR658-HilD1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>), or pSR658-HNS (LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS). *B*, expression of LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, and LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS was analyzed by Western blotting using polyclonal anti-LexA antibodies. As a loading control, the expression of GroEL was also determined using polyclonal anti-GroEL antibodies. MW, protein molecular weight standards (Precision Plus Protein™; Bio-Rad). The arrowheads indicate the expected bands. *C*, expression of the *sula-lacZ* fusion was determined in the *E. coli* SU101 reporter strain containing the plasmids pSR658 (LexA<sub>DBDwt</sub>), pSR658-HilD1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>), pSR658-HilD2 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-130</sub>), pSR658-HilD4 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub>), pSR658-HilD5 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub>), or pSR658-HilD3 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>130-309</sub>). The β-gal activity was determined from samples collected of bacterial cultures grown in LB at 37 °C up to an A<sub>600</sub> of 1.0. Expression of LexA<sub>DBDwt</sub> and the LexA<sub>DBDwt</sub> fusion proteins was induced by adding 1 mM IPTG to the medium. The data are the averages of three independent experiments performed in duplicate. The bars represent the standard deviations. \*\*\*, expression statistically significantly different compared with that reached in the presence of LexA<sub>DBDwt</sub> ( $p < 0.001$ ).

HilD<sub>221-309</sub> and LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, but not LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub>, induced the expression of the *hila-cat* fusion in *E. coli* K-12 (Fig. 5), showing that the LZ motif generates dimers of the DNA-binding domain of HilD, which are able to induce expression of target genes. Overall, these results demonstrate that HilD dimerizes through its central region spanning amino acids 130–220, which is essential for the regulatory activity of HilD.

#### HilE negatively affects the dimerization of HilD

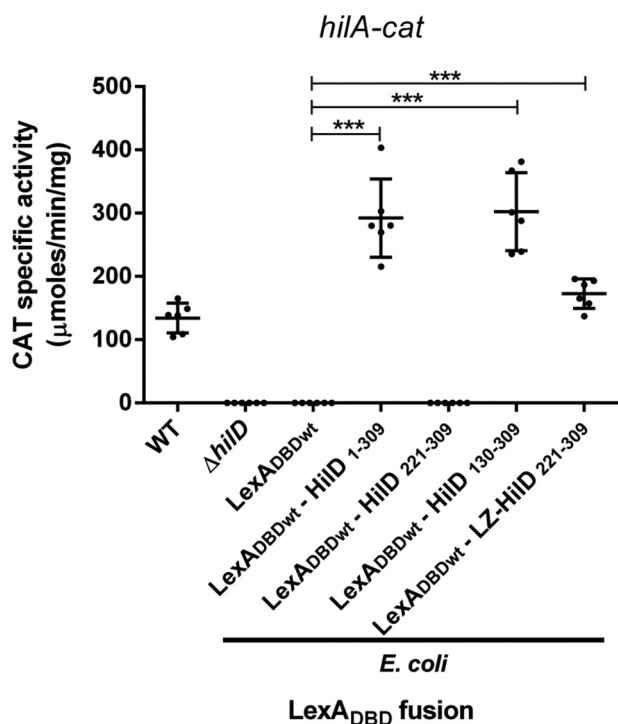
Based on the results described above, we now analyzed whether HilE affects the dimerization of HilD. For this, the LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> fusion protein, which carries the dimerization domain of HilD, was tested for homodimerization in the presence of the pA6-HilE1 plasmid expressing HilE or in the presence of the pPPM-A6Ω vector. Expression of HilE from pA6-HilE1 drastically reduced the SPI-1-mediated protein secretion profile of the WT *S. Typhimurium* strain (Fig. 7A), supporting that the amount of HilE reached from this plasmid

can negatively affect HilD. The effect of HilE on LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> and LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS, which dimerize through the LZ motif and the H-NS dimerization domain, respectively, was also assessed as negative controls. Interestingly, HilE affected the repression of *sula-lacZ* mediated by the dimerization of LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>; in contrast, it did not affect the repression of *sula-lacZ* mediated by the dimerization of LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> or LexA<sub>DBDwt</sub>-H-NS (Fig. 7B). These results indicate that HilE negatively affects the dimerization of HilD but not that of H-NS or the LZ motif tested.

#### HilE directly affects the DNA-binding domain of HilD

The results described above indicate that HilE affects the dimerization of HilD by interacting with the central region of this regulator, which in turn would indirectly inhibit its regulatory activity. However, our results revealed that HilE also interacts with the C-terminal region of HilD (Fig. 1B), carrying the DNA-binding domain, suggesting that HilE could also directly affect the DNA binding of HilD. To investigate this, we ana-

## HilE controls dimerization and DNA binding of HilD

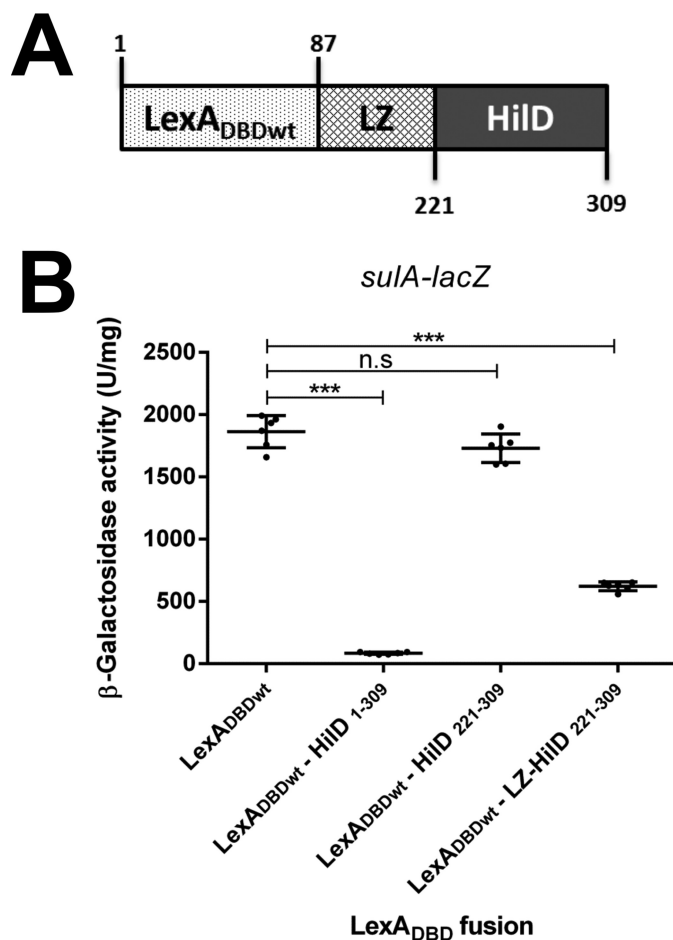


**Figure 5. Dimerization is required for the HilD regulatory activity.** Expression of the *hilA-cat* fusion contained in the *phlA-cat1* plasmid was tested in the WT *S. Typhimurium* SL1344 and its isogenic  $\Delta$ *hilD* mutant, as well as in the *E. coli* MC4100 strain carrying the plasmids pSR658 (LexA<sub>DBDwt</sub>), pSR658-HilD1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>), pSR658-HilD5 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub>), pSR658-HilD3 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>130-309</sub>), or pSR658-HilD6 (LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub>). The CAT-specific activity was determined from samples collected of bacterial cultures grown in LB at 37 °C up to an A<sub>600</sub> of 1.2. Expression of LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>130-309</sub>, and LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> was induced by adding 1 mM IPTG to the medium. The data are the averages of three independent experiments performed in duplicate. The bars represent the standard deviations. \*\*\*, expression statistically significantly different compared with that reached in the presence of LexA<sub>DBDwt</sub> ( $p < 0.001$ ).

lyzed the effect of HilE on the ability of the LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> and LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> to induce the expression of the *hilA-cat* fusion in *E. coli* K-12. The presence of HilE completely blocked the activity of *hilA-cat* induced by LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, carrying the full-length HilD protein and partially inhibited the activity of this fusion mediated by LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub>, containing the DNA-binding domain of HilD fused to the heterologous LZ dimerization motif (Fig. 8). These results, together with the results indicating that HilE does not affect the dimerization mediated by the LZ motif (Fig. 7B), show that HilE can directly affect the DNA-binding domain of HilD, independently of its effect on the dimerization of this regulator. Therefore, the higher negative effect of HilE on the regulatory activity of LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> than that of LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> (Fig. 8) could be the result of a double effect of HilE on LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, on the dimerization and the DNA-binding domain, and just one effect of HilE on LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub>, on the DNA-binding domain.

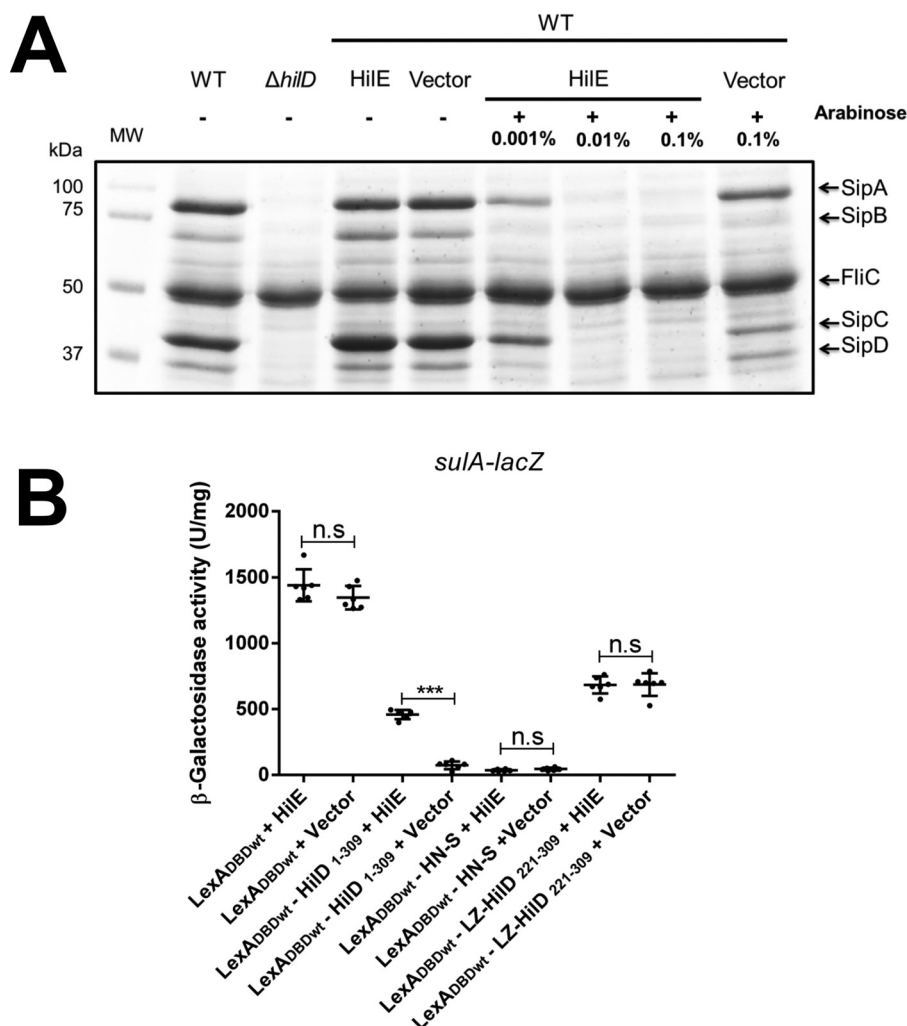
### HilE inhibits the DNA binding of HilD

Our results strongly support that HilE inhibits the DNA-binding activity of HilD. To confirm this, we performed competitive electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) with



**Figure 6. LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> dimerizes.** A, schematic representation of LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub>. The numbers indicate the residues of LexA<sub>DBD</sub> or HilD carried in this fusion protein. B, expression of the *sulA-lacZ* fusion was determined in the *E. coli* SU101 reporter strain containing the plasmids pSR658 (LexA<sub>DBDwt</sub>), pSR658-HilD1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>), pSR658-HilD5 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub>), or pSR658-HilD6 (LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub>). The  $\beta$ -gal activity was determined from samples collected of bacterial cultures grown in LB at 37 °C up to an A<sub>600</sub> of 1.0. Expression of LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub>, and LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> was induced by adding 1 mM IPTG to the medium. The data are the averages of three independent experiments performed in duplicate. The bars represent the standard deviations. \*\*\*, expression statistically significantly different compared with that reached in the presence of LexA<sub>DBDwt</sub> ( $p < 0.001$ ); n.s., no significant difference.

purified Trx-His-HilE and MBP-HilD proteins and a 50-bp fragment of the regulatory region of *hilC* carrying a HilD-binding site. As shown above, purified Trx-His-HilE interacts with HilD (Fig. 2B), and on the other hand, in a previous study we demonstrated that purified MBP-HilD binds to target genes in EMSAs (12). The *hilC* fragment was incubated with a constant concentration of MBP-HilD (0.5  $\mu$ M) without or with increasing concentrations of Trx-His-HilE (0.3, 0.5, 1.0, 1.5, and 2  $\mu$ M). Parallel binding reactions were performed with purified Trx-His instead Trx-His-HilE, as negative controls. From the concentration of 1.0  $\mu$ M, Trx-His-HilE, but not Trx-His, drastically reduced the formation of the DNA/MBP-HilD complex (Fig. 9, A and B), indicating that Trx-His-HilE interferes with the DNA binding of MBP-HilD. Additional binding reactions ruled out a possible DNA-binding activity of Trx-His-HilE, even at the highest concentration tested (2.0  $\mu$ M) (Fig. 9C).



**Figure 7. HilE inhibits the dimerization of HilD.** A, secretion of the SPI-1-encoded proteins SipA, SipB, SipC, and SipD was tested in the WT *S. Typhimurium* strain and its isogenic  $\Delta hilD$  mutant, as well as in the WT *S. Typhimurium* strain carrying the pA6-HilE1 plasmid expressing HilE from an arabinose-inducible promoter, or carrying the pMPM-A6 $\Omega$  vector, in the presence (+) or absence (-) of increasing concentrations of L-arabinose. Bacterial cultures were grown for 9 h in LB at 37 °C, and supernatants were analyzed in SDS-PAGE at 12%. FliC is a flagellar protein whose secretion is SPI-1-independent. MW, protein molecular weight standards (Precision Plus Protein™, Bio-Rad). B, expression of the *sulA-lacZ* fusion was determined in the *E. coli* SU101 reporter strain containing the pair of plasmids pSR658 and pA6-HilE1 (LexA<sub>DBDwt</sub> + HilE), pSR658 and pMPM-A6 $\Omega$  (LexA<sub>DBDwt</sub> + vector), pSR658-HilD1 and pA6-HilE1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + HilE), pSR658-HilD1 and pMPM-A6 $\Omega$  (LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub> + vector), pSR658-HNS and pA6-HilE1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-HNS + HilE), pSR658-HNS and pMPM-A6 $\Omega$  (LexA<sub>DBDwt</sub>-HNS + vector), pSR658-HilD6 and pA6-HilE1 (LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> + HilE), or pSR658-HilE6 and pMPM-A6 $\Omega$  (LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> + vector). The  $\beta$ -gal activity was determined from samples collected of bacterial cultures grown in LB at 37 °C up to an  $A_{600}$  of 1.0. Expression of LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HNS, and LexA<sub>DBDwt</sub>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> was induced by adding 1 mM IPTG to the medium. 0.1% L-arabinose was also added to induce the expression of HilE from pA6-HilE1. The data are the averages of three independent experiments performed in duplicate. The bars represent the standard deviations. \*\*\*, expression statistically significantly different compared with that reached in the absence of HilE ( $p < 0.001$ ); n.s., no significant difference.

Thus, these results further confirm the interaction of HilE with HilD and demonstrate that this interaction inhibits the HilD binding to DNA.

#### HilE shares sequence and structure similarities with Hcp proteins from T6SSs

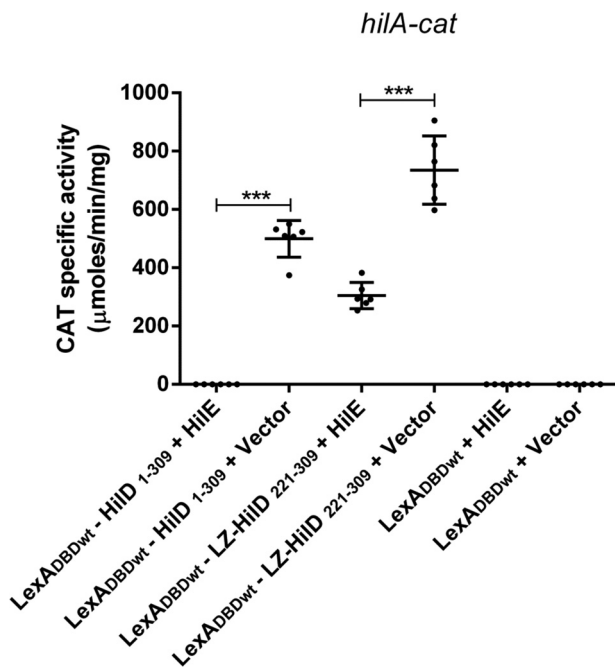
HilE was reported several years ago as a protein that does not present homology with any other protein in the databases (38). However, our recent BLASTp analysis revealed that the HilE sequence present an identity of ~30% with Hcp proteins from type 6 secretion systems (T6SSs) of different Gram-negative bacteria (Fig. 10A and data not shown). To determine whether HilE also presents structural analogy with the Hcp proteins, it was modeled by I-TASSER server (53, 54). HilE was successfully

modeled yielding a structure with a C-score of 1.07 and a TM-score of 0.86. The predicted structure is composed by a tight  $\beta$ -barrel domain with two  $\beta$ -sheets, with four and five  $\beta$ -strands each, flanked in one side by an  $\alpha$ -helix (Fig. 10B). The overall modeled structure of HilE highly resembles that described for the monomeric subunits of Hcp proteins: Hcp1 of *Pseudomonas aeruginosa* (55), Hcp1 of *Acinetobacter baumannii* (56), EvpC of *Edwardsiella tarda* (57), a T6SS effector (T6SSe) of *Yersinia pestis*,<sup>4</sup> and Hcp2 of *S. Typhimurium* (58) (Fig. 10C), showing TM values of 0.95, 0.89, 0.88, 0.86, and 0.78, respectively, with these proteins. TM values of >0.5 indicates

<sup>4</sup> E. V. Filippova, A. Halavaty, G. Minasov, L. Shuvalova, I. Dubrovskaya, J. Winsor, L. Papazisi, and W. F. Anderson, unpublished observations.



## HilE controls dimerization and DNA binding of HilD



**Figure 8. HilE directly affects the DNA-binding domain of HilD.** Expression of the *hilA-cat* fusion contained in the *phlA-cat1* plasmid was tested in the *E. coli* MC4100 strain carrying the pair of plasmids pSR658-HilD1 and pK6-HilE1 (LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup>-HilD<sub>1-309</sub> + HilE), pSR658-HilD1 and pMPM-K6Ω (LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup>-HilD<sub>1-309</sub> + vector), pSR658-HilD6 and pK6-HilE1 (LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> + HilE), pSR658-HilD6 and pMPM-K6Ω (LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> + vector), pSR658 and pK6-HilE1 (LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup> + HilE), or pSR658 and pMPM-K6Ω (LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup> + vector). The CAT-specific activity was determined from samples collected of bacterial cultures grown in LB at 37 °C up to an A<sub>600</sub> of 1.2. Expression of LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup>, LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup>-HilD<sub>1-309</sub>, and LexA<sub>DBD</sub><sup>wt</sup>-LZ-HilD<sub>221-309</sub> was induced by adding 1 mM IPTG to the medium. 0.1% L-arabinose was also added to induce the expression of HilE from pK6-HilE1. The data are the averages of three independent experiments performed in duplicate. The bars represent the standard deviations. \*\*\*, expression statistically significantly different compared with that reached in the absence of HilE ( $p < 0.001$ ).

structures sharing the same topology. These results are consistent with structural similarity shared between HilE and Hcp proteins.

### Discussion

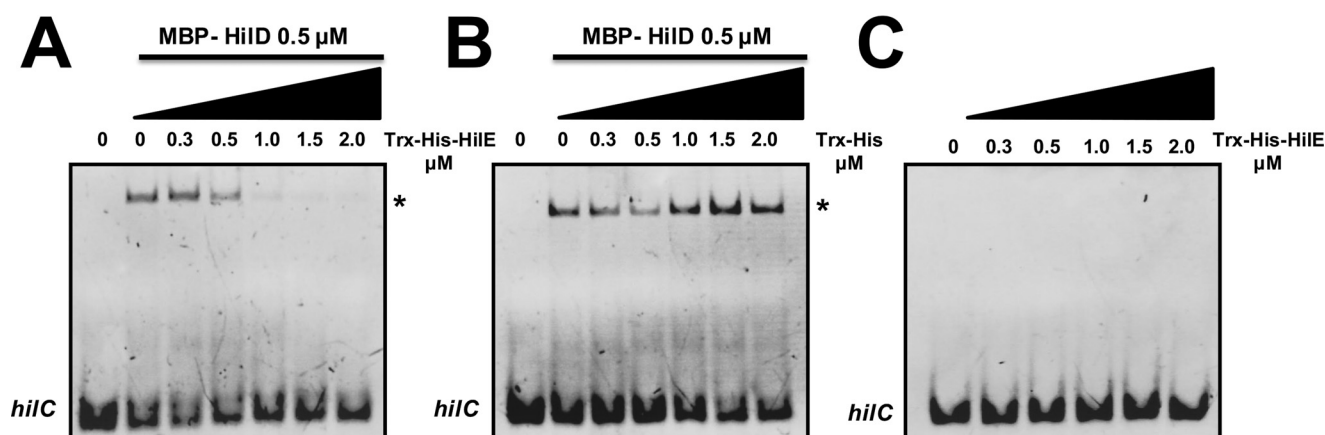
Negative regulation of HilE on the SPI-1 virulence genes is important for *Salmonella* fitness (59). Previously, it was shown that HilE negatively controls the expression of the SPI-1 genes by interacting with HilD, a central positive regulator for SPI-1 (38). In this study, we show that HilE specifically regulates the DNA-binding activity of HilD by inhibiting the dimerization and by directly acting on the DNA-binding domain of this regulator. In agreement with this, a recent study also found that HilE blocks the DNA binding of HilD (60). Our results indicate that HilD requires dimerization to induce the expression of target genes. Consistently, the HilD-binding sites on different genes have two direct repeat sequences (21, 27, 51). Several other AraC-like transcriptional regulators act as dimers, such as ToxT, ExsA, UreR, and AggR, which control expression of virulence genes in *Vibrio cholerae*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, and *E. coli* (45, 48, 49, 61, 62). HilE interacts with the central region of HilD and thus inhibits its dimerization, which indirectly would affect the DNA-binding activity of this regulator. Additionally, HilE interacts with the C-terminal region of

HilD containing the DNA-binding domain, which negatively affects the transcriptional activity of HilD independently of its dimerization. This double interaction and effect supports a tight control of the HilD activity by HilE. In enteroaggregative *E. coli*, the Aar protein interacts with the central region of AggR, containing the dimerization domain, inhibiting the dimerization and the DNA binding of this AraC-like regulator (62). Similarly, in *P. aeruginosa*, the ExsD protein interacts with the N-terminal region of ExsA, containing the dimerization domain, thus preventing the dimerization and DNA binding of this regulator (45, 61, 63). Neither Aar nor ExsD seem to directly compromise the DNA-binding domain of their target regulators. One example of a protein that directly acts on the DNA-binding domain of a transcriptional regulator is the control exerted by CarS on the CarA repressor in *Myxococcus xanthus*. CarS binds to the DNA-binding domain of CarA and thus inhibits its interaction with target genes; interestingly, the structure of CarS mimics the operator DNA recognized by CarA (64). Further studies, such as three-dimensional analysis, are required to determine the precise stoichiometry and the amino acids mediating the interaction between HilE and HilD, which is a matter of our current investigation.

Protein-protein interaction has been shown to regulate the stability of transcriptional regulators. For instance, FliT interacts with the FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> complex, the central positive regulator of the flagellar genes, which enhances the degradation of FlhC subunit by the ClpXP protease (65). Our results discarded a negative effect of HilE on the stability of HilD in the growth conditions tested, further supporting that HilE only controls the regulatory activity of HilD. However, because HilD positively autoregulates (15, 26), HilE indirectly controls the expression and thus the amount of HilD.

Interestingly, we found that HilE shares sequence identity and structure analogy with Hcp proteins from different Gram-negative bacteria; thus, HilE could be postulated as a Hcp-like protein. Important to note, the Hcp-like proteins, including HilE, conserve high structure similarity but low sequence identity among them (55) (Fig. 10A). The Hcp proteins are structural components of the T6SSs, which are translocation machines that resemble an inverted phage tail, involved in different functions such as antibacterial activity and virulence (66, 67). Interestingly, the T6SSs components, including the Hcp proteins, are closely related to those of the phages tail, which work as channels for DNA delivery into bacteria (66, 67). Specifically, the Hcp proteins form a hexameric ring structure that stacks in a head-to-tail fashion, forming the tube through which T6SS effector proteins are either injected from the bacterial cytoplasm into the prey cell or released to the extracellular milieu (66–68). Furthermore, the Hcp proteins can also act as chaperones that help to the translocation of the T6SS effector proteins (69). *S. Typhimurium* possesses a functional T6SS, which is encoded in SPI-6 (70). Whether HilE has a structural/chaperone role in this T6SS remains to be determined.

The *hilE* gene is located in a genomic region that shows characteristics to be acquired by *Salmonella* (Fig. S2) (38); BLASTp analysis indicated that the other proteins also encoded in this *Salmonella* genomic island do not show homology with any protein related to the T6SSs. It is tempting to speculate that



**Figure 9. HilE inhibits the DNA-binding activity of HilD.** Competitive nonradioactive EMSAs were performed to analyze the effect of HilE on the DNA-binding activity of HilD. *A* and *B*, a 50-pb DNA fragment of *hilC*, containing a HilD-binding site, was incubated with purified MBP-HilD (0.5 μM) and increasing concentrations (0, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 μM) of purified Trx-His-HilE (*A*) or Trx-His (*B*) proteins. *C*, EMSA was performed to evaluate DNA-binding activity of HilE. The 50-pb DNA fragment of *hilC* was incubated with increasing concentrations of purified Trx-His-HilE (0, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 μM). The DNA-protein complexes are indicated with asterisk and were resolved in a nondenaturing 6% polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide.

HilE diverged from an ancestral T6SS or phage Hcp protein. Thus, our results could illustrate the adaptation of a structural protein, during the evolution of *Salmonella*, to act as a regulator of virulence genes expression.

## Experimental procedures

### Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains used in this study are listed in Table S1. Bacterial cultures were grown in LB containing 1% tryptone, 0.5% yeast extract, and 1% NaCl at pH 7.5. When necessary, the media were supplemented with the following antibiotics: ampicillin (200 μg/ml), streptomycin (100 μg/ml), tetracycline (12 μg/ml), or kanamycin (20 μg/ml). Cultures for the determination of chloramphenicol acetyltransferase activity (CAT) and for the LexA-based genetic system assays were performed as we described previously (12, 28, 50).

### Construction of plasmids

Plasmids and primers used in this study are listed in Table S1 and Table S2, respectively. To construct the plasmids pSR658-HilD1, pSR658-HilD2, pSR658-HilD3, pSR658-HilD4, and pSR658-HilD5, fragments of the *hilD* gene were amplified by PCR using the primers pairs HilD-SacI/HilDexR-PstI, HilD-SacI/HilD-130, HilD130-2/HilDexR-PstI, HilD-SacI/HilD-220, and HilD-221/HilDexR-PstI, respectively. The resulting PCR products were digested with SacI and PstI and cloned into the vector pSR658 digested with the same restriction enzymes. To construct the pSR659-HilE1 plasmid, the *hilE* gene was amplified by PCR using the primers HilE-SacI and HilE-HindIII-3'. The resulting PCR product was digested with SacI and HindIII and cloned into the vector pSR659 digested with the same restriction enzymes. To construct the plasmid pSR658-HilD6, the DNA fragment encoding 35 amino acids of the LZ motif from GCN4 of *S. cerevisiae* was amplified by PCR using the primers LZ-F and HilD221LZR and DNA of the pUT18C-zip plasmid as template. The fragment encoding the region of HilD from codons 221 to 309 (HilD<sub>221-309</sub>) was also amplified by PCR using the LZ-HilD221F and HilDexR-PstI primers. Then the LZ and HilD<sub>221-309</sub> fragments were fused by

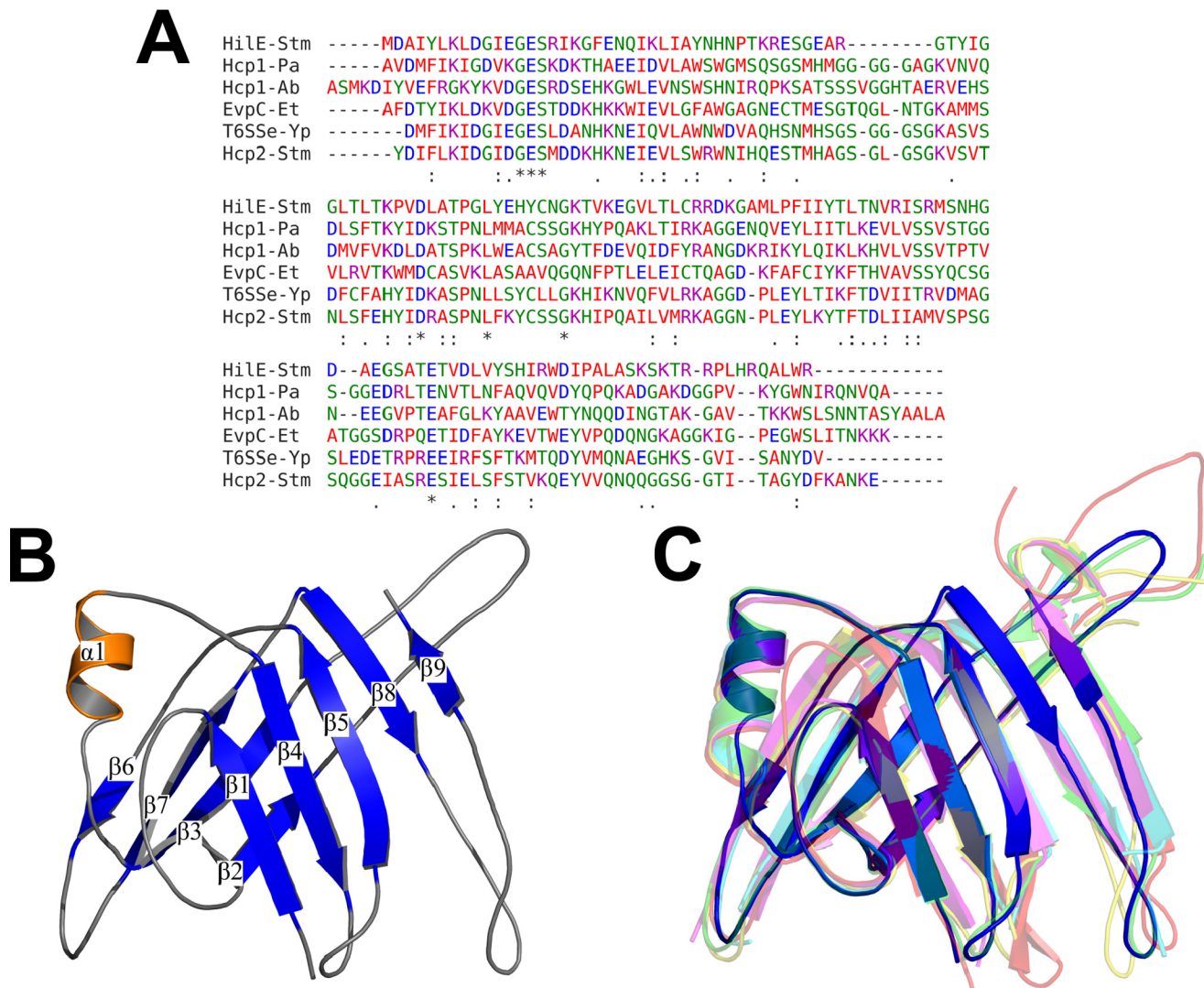
overlap extension PCR using the LZ-F and HilDexR-PstI primers. The resulting PCR product was digested with XhoI and PstI and cloned into the pSR658 vector digested with the same restriction enzymes. To construct the pA6-HilE1 and pK6-HilE1 plasmids, the *hilE* gene was amplified by PCR using the HilE-NcoI-2 and HilE-His<sub>6</sub> primers. The resulting PCR product was digested with NcoI and HindIII and cloned into the pMPPM-A6Ω or pMPPM-K6Ω vectors digested with the same restriction enzymes. To construct the plasmid pET32-HilE expressing the Trx-His-HilE fusion protein, the *hilE* gene was amplified by PCR using the HilE-NcoI-2 and HilE-PUT-BamHI primers. The resulting PCR product was digested with NcoI and BamHI and cloned into the pET32b(+) vector digested with the same restriction enzymes.

### HilD dimerization assays

To test dimerization of HilD, the plasmids pSR658, pSR658-HilD1, or pSR658-HNS were transformed into the *E. coli* SU101 reporter strain for homodimerization assays, which carries the chromosomal *sula-lacZ* transcriptional fusion (43, 44). Likewise, to determine the region of HilD containing the dimerization domain, the plasmids pSR658, pSR658-HilD1, pSR658-HilD2, pSR658-HilD3, pSR658-HilD4, or pSR658-HilD5 were transformed into the same reporter strain. Transformants were grown in LB with tetracycline and 1 mM IPTG to induce expression of LexA<sub>DBD</sub> and LexA<sub>DBD</sub> fusion proteins. The samples were collected at an  $A_{600}$  of 1.0 and used for the determination of β-gal activity.

To test whether HilE affects the dimerization of HilD, the *E. coli* SU101 reporter strain was first transformed with the plasmids pSR658, pSR658-HilD1, pSR658-HNS, or pSR658-HilD6 and then transformed with the pMPPM-A6Ω vector or the pA6-HilE1 plasmid expressing HilE from the arabinose-inducible promoter. Transformants were grown in LB with tetracycline and ampicillin, as well as with 1 mM IPTG to induce the expression of LexA<sub>DBD</sub> and LexA<sub>DBD</sub> fusion proteins and with 0.1% L-arabinose to induce the expression of HilE. The samples were collected at an  $A_{600}$  of 1.0 and used for the determination of β-gal activity.

## HilE controls dimerization and DNA binding of HilD



**Figure 10. Sequence and structure comparison of HilE with Hcp proteins.** A, sequence alignment of HilE and five Hcp proteins: Hcp1 of *P. aeruginosa* (Hcp1-Pa), Hcp1 of *A. baumannii* (Hcp1-Ab), EvpC of *E. tarda* (EvpC-Et), T6Sse of *Y. pestis* (T6Sse-Yp), and Hcp2 of *S. Typhimurium* (Hcp2-Stm). B, ribbon representation of the HilE predicted structure with I-TASSER server, colored by secondary structure:  $\beta$ -strands (blue),  $\alpha$ -helix (orange) and loops (gray). C, overlapping of the HilE predicted structure (blue) with the crystallographic structure of the proteins Hcp1-Pa (PDB code 4KSR) (red), Hcp1-Ab (PDB code 4W64) (green), EvpC-Et (PDB code 3EAA) (yellow), T6Sse-Yp (PDB code 3V4H) (cyan), and Hcp2-Stm (PDB code 5XEU) (magenta).

### HilD–HilE heterodimerization assays

To test the interaction between HilD and HilE, the *E. coli* SU202 reporter strain for heterodimerization assays, which carries the *sula*–*lacZ* transcriptional fusion with a hybrid LexA operator (43, 44) was first transformed with the plasmids pSR658, pSR658–HilD1, pSR658–HilD2, pSR658–HilD4, or pSR658–HilD5 and then transformed with the pSR659 vector or the pSR659–HilE1 plasmid. Transformants were grown in LB with tetracycline and ampicillin and with 1 mM IPTG to induce expression of LexA<sub>DBD</sub> and LexA<sub>DBD</sub> fusion proteins. The samples were collected at an  $A_{600}$  of 1.0 and used for the determination of  $\beta$ -gal activity.

### $\beta$ -gal assays

The  $\beta$ -gal assay and protein quantification to calculate specific activities were performed as previously described (71).

### CAT assays

The CAT assays and protein quantification to calculate CAT-specific activities were performed as previously described (72).

### Western blotting

Whole-cell extracts were prepared from bacterial samples collected at the indicated time points from LB cultures. 10  $\mu$ g of each extract were subjected to electrophoresis in SDS-12% polyacrylamide gels and then transferred to 0.45- $\mu$ m pore size nitrocellulose membranes (Merck), using a semidry transfer apparatus (Bio-Rad). The membranes containing the transferred proteins were blocked in 5% nonfat milk overnight and then incubated with anti-c-Myc (Sigma, catalog no. M4439) or anti-His<sub>6</sub> (Roche, catalog no. 11922416001) monoclonal antibodies at 1:5000 and 1:1000 dilutions, respectively, or with anti-LexA (Abcam, catalog no. ab14553) or anti-GroEL (Sigma, cat-



alog no. G6532) polyclonal antibodies at 1:10,000 and 1:100,000 dilutions, respectively. Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse (Sigma, catalog no. A9044) or anti-rabbit (Rockland, catalog no. 611-1302) at a dilution of 1:10,000 were used as the secondary antibodies. The bands on the blotted membranes were developed by incubation with the Western Lightning Chemiluminescence reagent plus (PerkinElmer) and exposed to Kodak X-Omat films or Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

#### Expression and purification of MBP-HilD

Expression and purification of MBP-HilD were performed as we previously described (12).

#### Expression and purification of Trx-His and Trx-His-HilE

The Trx-His and Trx-His-HilE proteins were expressed in *E. coli* BL21/DE3 carrying the pET32b(+) or pET32-HilE plasmids, respectively, and purified from soluble bacterial extracts by using Ni-NTA-agarose columns (Qiagen). Bacterial cultures were grown in 250 ml of LB with ampicillin up to an  $A_{600}$  of 0.6, at 37 °C. Then the expression of Trx-His or Trx-His-HilE was induced by adding 1 mM IPTG, and the cultures were incubated at 30 °C for 4 h. Bacteria were collected by centrifugation at 4 °C, and the pellets were washed once with ice-cold binding buffer (5 mM imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) and resuspended in 30 ml of the same buffer. The cells were lysed with French press, and bacterial debris were removed by centrifugation at 4 °C. The soluble bacterial extracts were loaded into Ni-NTA-agarose columns previously equilibrated with 50 ml of binding buffer. The columns were washed with 100 ml of binding buffer and then with 100 ml of wash buffer (20 mM imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0). The proteins were eluted with elution buffer (250 mM imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0). The collected fractions were analyzed in a 12% SDS-PAGE. Those fractions containing the purified Trx-His and Trx-His-HilE proteins were loaded into a Slide-A-Lyzer 7K cassette (Thermo) and dialyzed at 4 °C in a buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 40 mM KCl, 1 mM EDTA, and 20% (v/v) glycerol. Protein concentration was determined by the Bradford procedure. Aliquots of the purified Trx-His and Trx-His-HilE proteins were stored at -70 °C.

#### Electrophoretic mobility assays

EMSAs were performed using the purified MBP-HilD, Trx-His-HilE, or Trx-His proteins and a 50-bp DNA fragment of *hilC* containing a binding site of HilD. The 50-bp *hilC* fragment was generated by annealing the complementary primers HilCRR-F and HilCRR-R. For this, the primers, each at a final concentration of 15  $\mu$ M, were boiled together at 95 °C for 10 min and then slowly cooling to room temperature. Competitive binding reactions were performed by mixing ~100 ng of the *hilC* fragment with MBP-HilD (0.5  $\mu$ M) and increasing amounts of Trx-His-HilE or Trx-His (0.3, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0  $\mu$ M), in a total volume of 20  $\mu$ l of binding buffer containing 100  $\mu$ g/ml BSA, 30 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM EDTA, 3 mM DTT, 200 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, and 5% glycerol. For noncompetitive EMSAs, only increasing amounts of Trx-His-HilE purified protein (0.3, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0  $\mu$ M) were used. Protein-DNA

## HilE controls dimerization and DNA binding of HilD

binding reactions were incubated at 37 °C for 20 min and then electrophoretically separated in 6% nondenaturing polyacrylamide gels in 0.5× Tris borate-EDTA buffer, at room temperature. The DNA fragments were stained with ethidium bromide and visualized with an Alpha-Imager UV Transilluminator (Alpha Innotech Corp.).

#### HilD stability assays

HilD stability assays were performed as we described previously (33). The values for HilD-Myc bands were normalized with respect to those for GroEL bands, and then the relative percentage of HilD-Myc at each indicated time, with respect to time 0, was calculated. The half-life time ( $t_{1/2}$ ) of HilD was calculated by one phase decay equation.

#### Protein secretion analysis

Protein secretion assays were performed as we described previously (28). The samples were analyzed in a 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

#### Gel-filtration assay

The purified protein MBP-HilD was subjected to gel filtration chromatography analysis by using AKTA-FPLC system (Superdex 200 HiLoad™ 26/60 column; GE Healthcare Life Sciences), with a flow rate of 0.5 ml/min and a pressure limit of 0.3 MPa, in a buffer containing 200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl at 20 °C. The column was precalibrated by using a gel filtration molecular weight markers kit (Sigma-Aldrich) including cytochrome *c* from horse heart (12.4 kDa), carbonic anhydrase from bovine erythrocytes (29 kDa), albumin bovine serum (66 kDa), alcohol dehydrogenase from yeast (150 kDa), and  $\beta$ -amylase from sweet potato (200 kDa). The relative molecular mass of MBP-HilD was determined by comparison to the five-point molecular weight calibration curve.

#### Pulldown assays

Pulldown assays were performed with purified Trx-His-HilE or Trx-His fusion proteins and whole-cell extracts from *E. coli* SU101 expressing LexA<sub>DBDwt</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-309</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-130</sub>, LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>1-220</sub>, or LexA<sub>DBDwt</sub>-HilD<sub>221-309</sub>. To immobilize the bait protein, 15  $\mu$ g of purified Trx-His-HilE or Trx-His were incubated for 1 h at 10 °C with 80  $\mu$ l of Ni-NTA resin (Qiagen) previously equilibrated with lysis buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole, pH 8.0) in a 1.5-ml microcentrifuge tube. The resin containing the immobilized bait protein was washed with 1 ml of wash buffer (70 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 35 mM imidazole, pH 8.0) by centrifugation at 4000 × *g* for 1 min. The supernatant was carefully removed, and then the resin was incubated for 1 h at 10 °C with 80  $\mu$ l of the whole-cell extract containing the respective prey protein. To remove the unbound proteins, the resin was washed five times with 1 ml of wash buffer by centrifugation at 4000 × *g* for 1 min. Finally, the resin was resuspended with 20  $\mu$ l of SDS loading buffer containing 1.5% of  $\beta$ -mercaptoethanol and boiled for 5 min at 99 °C. After this, the samples were analyzed by Western blotting.



# HilE controls dimerization and DNA binding of HilD

## Sequence alignment and structure prediction of HilE

The sequence of HilE and that of some Hcp proteins were aligned using the Clustal Omega server (73). The sequence of HilE was submitted to I-TASSER server for structural modeling (53, 54), and a final model with a C score of 1.07, a TM score of 0.86, and a root mean square deviation of 2.7 Å was selected. All molecular graphics were done in PyMOL version 1.8 (PyMOL Molecular Graphics System, version 1.8).

## Statistical analysis

Data from CAT and  $\beta$ -gal assays were analyzed using one-way analysis of variance with the Tukey's multiple comparison test. A  $p$  value of  $< 0.05$  was considered significant. This statistical analysis was performed using Prism 6 program version 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

**Author contributions**—C. C. P.-A. and V. H. B. formal analysis; C. C. P.-A., G. V.-G., V. R. J.-G., E. R.-P., and V. H. B. investigation; C. C. P.-A. visualization; C. C. P.-A. methodology; C. C. P.-A. and V. H. B. writing-original draft; C. C. P.-A., G. V.-G., E. R.-P., and V. H. B. writing-review and editing; V. H. B. conceptualization; V. H. B. supervision; V. H. B. funding acquisition.

**Acknowledgments**—We thank F. J. Santana and M. Fernández-Mora for technical assistance, I. Gómez-Gómez for advice and assistance in the protein purification assays, D. Perez-Morales for standardization of the protein stability assays, and G. Soberón-Chavez and I. Martínez-Flores for critical reading of the manuscript.

## References

1. Haraga, A., Ohlson, M. B., and Miller, S. I. (2008) *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 53–66 [CrossRef Medline](#)
2. Sánchez-Vargas, F. M., Abu-El-Haija, M. A., and Gómez-Duarte, O. G. (2011) *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel. Med. Infect. Dis.* **9**, 263–277 [CrossRef Medline](#)
3. Ohl, M. E., and Miller, S. I. (2001) *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Med.* **52**, 259–274 [CrossRef Medline](#)
4. Fàbrega, A., and Vila, J. (2013) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 308–341 [CrossRef Medline](#)
5. Porwollik, S., and McClelland, M. (2003) Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infect.* **5**, 977–989 [CrossRef Medline](#)
6. Ilyas, B., Tsai, C. N., and Coombes, B. K. (2017) Evolution of *Salmonella*–host cell interactions through a dynamic bacterial genome. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 428 [CrossRef Medline](#)
7. Hansen-Wester, I., and Hensel, M. (2001) *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect.* **3**, 549–559 [CrossRef Medline](#)
8. Moest, T. P., and Méresse, S. (2013) *Salmonella* T3SSs: successful mission of the secret(ion) agents. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 38–44 [CrossRef Medline](#)
9. Eade, C. R., Hung, C. C., Bullard, B., Gonzalez-Escobedo, G., Gunn, J. S., and Altier, C. (2016) Bile acids function synergistically to repress invasion gene expression in *Salmonella* by destabilizing the invasion regulator HilD. *Infect. Immun.* **84**, 2198–2208 [CrossRef Medline](#)
10. Hung, C. C., Garner, C. D., Schlauch, J. M., Dwyer, Z. W., Lawhon, S. D., Frye, J. G., McClelland, M., Ahmer, B. M., and Altier, C. (2013) The intestinal fatty acid propionate inhibits *Salmonella* invasion through the post-translational control of HilD. *Mol. Microbiol.* **87**, 1045–1060 [CrossRef Medline](#)
11. Lawhon, S. D., Maurer, R., Suyemoto, M., and Altier, C. (2002) Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella* Typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol. Microbiol.* **46**, 1451–1464 [CrossRef Medline](#)
12. Bustamante, V. H., Martínez, L. C., Santana, F. J., Knodler, L. A., Steele-Mortimer, O., and Puente, J. L. (2008) HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 14591–14596 [CrossRef Medline](#)
13. Miao, E. A., and Miller, S. I. (2000) A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella* Typhimurium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 7539–7544 [CrossRef Medline](#)
14. Golubeva, Y. A., Sadik, A. Y., Ellermeier, J. R., and Schlauch, J. M. (2012) Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *Genetics*. **190**, 79–90 [CrossRef Medline](#)
15. Ellermeier, C. D., Ellermeier, J. R., and Schlauch, 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 [CrossRef Medline](#)
16. Saini, S., Ellermeier, J. R., Schlauch, J. M., and 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**, e1001025 [CrossRef Medline](#)
17. Petrone, B. L., Stringer, A. M., and Wade, J. T. (2014) Identification of HilD-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **196**, 1094–1101 [CrossRef Medline](#)
18. Martínez, L. C., Banda, M. M., Fernández-Mora, M., Santana, F. J., and Bustamante, V. H. (2014) HilD induces expression of SPI-2 genes by displacing the global negative regulator H-NS from *ssrAB*. *J. Bacteriol.* **196**, 3746–3755 [CrossRef Medline](#)
19. Main-Hester, K. L., Colpitts, K. M., Thomas, G. A., Fang, F. C., and Libby, S. J. (2008) Coordinate regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* **76**, 1024–1035 [CrossRef Medline](#)
20. Martínez-Flores, I., Pérez-Morales, D., Sánchez-Pérez, M., Paredes, C. C., Collado-Vides, J., Salgado, H., and 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**, 37858 [CrossRef Medline](#)
21. Singer, H. M., Kühne, C., Deditius, J. A., Hughes, K. T., and Erhardt, M. (2014) The *Salmonella* Spi1 virulence regulatory protein HilD directly activates transcription of the flagellar master operon *flhDC*. *J. Bacteriol.* **196**, 1448–1457 [CrossRef Medline](#)
22. Cordero-Alba, M., and Ramos-Morales, F. (2014) Patterns of expression and translocation of the ubiquitin ligase SlrP in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **196**, 3912–3922 [CrossRef Medline](#)
23. Thijs, I. M., De Keersmaecker, S. C., Fadda, A., Engelen, K., Zhao, H., McClelland, M., Marchal, K., and Vanderleyden, J. (2007) Delineation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulon through genome-wide location and transcript analysis. *J. Bacteriol.* **189**, 4587–4596 [CrossRef Medline](#)
24. Colgan, A. M., Kröger, C., Diard, M., Hardt, W. D., Puente, J. L., Sivasankaran, S. K., Hokamp, K., and Hinton, J. C. (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**, e1006258 [CrossRef Medline](#)
25. Smith, C., Stringer, A. M., Mao, C., Palumbo, M. J., and Wade, J. T. (2016) Mapping the regulatory network for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion. *MBio.* **7**, e01024-01016 [Medline](#)
26. Olekhovich, I. N., and Kadner, R. J. (2002) DNA-binding activities of the HilC and HilD virulence regulatory proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **184**, 4148–4160 [CrossRef Medline](#)
27. Olekhovich, I. N., and 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 [CrossRef Medline](#)
28. Martínez, L. C., Yakhnin, H., Camacho, M. I., Georgellis, D., Babitzke, P., Puente, J. L., and 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**, 1637–1656 [CrossRef Medline](#)
29. Ellermeier, J. R., and Schlauch, J. M. (2008) Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. *J. Bacteriol.* **190**, 476–486 [CrossRef Medline](#)

30. Chubiz, J. E., Golubeva, Y. A., Lin, D., Miller, L. D., and Slauch, J. M. (2010) FliZ regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion locus by controlling HilD protein activity in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **192**, 6261–6270 [CrossRef Medline](#)
31. Takaya, A., Kubota, Y., Isogai, E., and Yamamoto, T. (2005) Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads to downregulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Mol. Microbiol.* **55**, 839–852 [Medline](#)
32. Boddicker, J. D., and Jones, B. D. (2004) Lon protease activity causes downregulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells. *Infect. Immun.* **72**, 2002–2013 [CrossRef Medline](#)
33. De la Cruz, M. A., Pérez-Morales, D., Palacios, I. J., Fernández-Mora, M., Calva, E., and Bustamante, V. H. (2015) The two-component system CpxR/A represses the expression of *Salmonella* virulence genes by affecting the stability of the transcriptional regulator HilD. *Front. Microbiol.* **6**, 807 [Medline](#)
34. Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., Hinton, J. C., and Van Immerseel, F. (2006) Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 946–949 [CrossRef Medline](#)
35. Huang, Y., Suyemoto, M., Garner, C. D., Cicconi, K. M., and Altier, C. (2008) Formate acts as a diffusible signal to induce *Salmonella* invasion. *J. Bacteriol.* **190**, 4233–4241 [CrossRef Medline](#)
36. Golubeva, Y. A., Ellermeier, J. R., Cott Chubiz, J. E., and Slauch, J. M. (2016) Intestinal long-chain fatty acids act as a direct signal to modulate expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *MBio.* **7**, e02170-02115 [Medline](#)
37. López-Garrido, J., Puerta-Fernández, E., Cota, I., and Casadesús, J. (2015) Virulence gene regulation by L-arabinose in *Salmonella enterica*. *Genetics* **200**, 807–819 [CrossRef Medline](#)
38. Baxter, M. A., Fahlen, T. F., Wilson, R. L., and Jones, B. D. (2003) HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect. Immun.* **71**, 1295–1305 [CrossRef Medline](#)
39. Baxter, M. A., and Jones, B. D. (2015) Two-component regulators control *hilA* expression by controlling *fimZ* and *hilE* expression within *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* **83**, 978–985 [CrossRef Medline](#)
40. Espinosa, E., and Casadesús, J. (2014) Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 (SPI-1) by the LysR-type regulator LeuO. *Mol. Microbiol.* **91**, 1057–1069 [CrossRef Medline](#)
41. Gong, H., Vu, G. P., Bai, Y., Chan, E., Wu, R., Yang, E., Liu, F., and Lu, S. (2011) A *Salmonella* small non-coding RNA facilitates bacterial invasion and intracellular replication by modulating the expression of virulence factors. *PLoS Pathog.* **7**, e1002120 [CrossRef Medline](#)
42. Lim, S., Yun, J., Yoon, H., Park, C., Kim, B., Jeon, B., Kim, D., and Ryu, S. (2007) Mlc regulation of *Salmonella* pathogenicity island I gene expression via *hilE* repression. *Nucleic Acids Res.* **35**, 1822–1832 [CrossRef Medline](#)
43. Dmitrova, M., Younés-Cauet, G., Oertel-Buchheit, P., Porte, D., Schnarr, M., and Granger-Schnarr, M. (1998) A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **257**, 205–212 [CrossRef Medline](#)
44. Daines, D. A., and Silver, R. P. (2000) Evidence for multimerization of neu proteins involved in polysialic acid synthesis in *Escherichia coli* K1 using improved LexA-based vectors. *J. Bacteriol.* **182**, 5267–5270 [CrossRef Medline](#)
45. Brutinel, E. D., Vakulskas, C. A., and Yahr, T. L. (2010) ExsD inhibits expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system by disrupting ExsA self-association and DNA-binding activity. *J. Bacteriol.* **192**, 1479–1486 [CrossRef Medline](#)
46. Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., and Ramos, J. L. (1997) AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 393–410 [Medline](#)
47. Bustos, S. A., and Schleif, R. F. (1993) Functional domains of the AraC protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 5638–5642 [CrossRef Medline](#)
48. Poore, C. A., Coker, C., Dattelbaum, J. D., and Mobley, H. L. (2001) Identification of the domains of UreR, an AraC-like transcriptional regulator of the urease gene cluster in *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol.* **183**, 4526–4535 [Medline](#)
49. Prouty, M. G., Osorio, C. R., and Klose, K. E. (2005) Characterization of functional domains of the *Vibrio cholerae* virulence regulator ToxT. *Mol. Microbiol.* **58**, 1143–1156 [CrossRef Medline](#)
50. Martínez, L. C., Martínez-Flores, I., Salgado, H., Fernández-Mora, M., Medina-Rivera, A., Puente, J. L., Collado-Vides, J., and Bustamante, V. H. (2014) *In silico* identification and experimental characterization of regulatory elements controlling the expression of the *Salmonella* *csrB* and *csrC* genes. *J. Bacteriol.* **196**, 325–336 [CrossRef Medline](#)
51. Schechter, L. M., and Lee, C. A. (2001) AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella* Typhimurium *hilA* promoter. *Mol. Microbiol.* **40**, 1289–1299 [CrossRef Medline](#)
52. Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 5752–5756 [CrossRef Medline](#)
53. Zhang, Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40 [CrossRef Medline](#)
54. Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* **5**, 725–738 [CrossRef Medline](#)
55. Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., Goodman, A. L., Joachimiak, G., Ordoñez, C. L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A., and Mekalanos, J. J. (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*. **312**, 1526–1530 [CrossRef Medline](#)
56. Ruiz, F. M., Santillana, E., Spínola-Amilibia, M., Torreira, E., Culebras, E., and Romero, A. (2015) Crystal structure of Hcp from *Acinetobacter baumannii*: a component of the type VI secretion system. *PLoS One* **10**, e0129691 [CrossRef Medline](#)
57. Jobichen, C., Chakraborty, S., Li, M., Zheng, J., Joseph, L., Mok, Y. K., Leung, K. Y., and Sivaraman, J. (2010) Structural basis for the secretion of EvpC: a key type VI secretion system protein from *Edwardsiella tarda*. *PLoS One* **5**, e12910 [CrossRef Medline](#)
58. Lin, Q. P., Gao, Z. Q., Geng, Z., Zhang, H., and Dong, Y. H. (2017) Crystal structure of the putative cytoplasmic protein STM0279 (Hcp2) from *Salmonella* Typhimurium. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **73**, 463–468 [CrossRef Medline](#)
59. Sturm, A., Heinemann, M., Arnoldini, M., Benecke, A., Ackermann, M., Benz, M., Dormann, J., and Hardt, W. D. (2011) The cost of virulence: retarded growth of *Salmonella* Typhimurium cells expressing type III secretion system 1. *PLoS Pathog.* **7**, e1002143 [CrossRef Medline](#)
60. Grenz, J. R., Cott Chubiz, J. E., Thaprawat, P., and Slauch, J. M. (2018) HilE regulates HilD by blocking DNA binding in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **10.1128/JB.00750-17**
61. Brutinel, E. D., Vakulskas, C. A., and Yahr, T. L. (2009) Functional domains of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *J. Bacteriol.* **191**, 3811–3821 [CrossRef Medline](#)
62. Santiago, A. E., Yan, M. B., Tran, M., Wright, N., Luzader, D. H., Kendall, M. M., Ruiz-Perez, F., and Nataro, J. P. (2016) A large family of anti-activators accompanying XylS/AraC family regulatory proteins. *Mol. Microbiol.* **101**, 314–332 [CrossRef Medline](#)
63. Thibault, J., Faudry, E., Ebel, C., Attree, I., and Elsen, S. (2009) Anti-activator ExsD forms a 1:1 complex with ExsA to inhibit transcription of type III secretion operons. *J. Biol. Chem.* **284**, 15762–15770 [CrossRef Medline](#)
64. León, E., Navarro-Avilés, G., Santiveri, C. M., Flores-Flores, C., Rico, M., González, C., Murillo, F. J., Elías-Arnanz, M., Jiménez, M. A., and Padmanabhan, S. (2010) A bacterial antirepressor with SH3 domain topology mimics operator DNA in sequestering the repressor DNA recognition helix. *Nucleic Acids Res.* **38**, 5226–5241 [CrossRef Medline](#)
65. Sato, Y., Takaya, A., Mouslim, C., Hughes, K. T., and Yamamoto, T. (2014) FliT selectively enhances proteolysis of FlhC subunit in FlhD4C2 complex by an ATP-dependent protease, ClpXP. *J. Biol. Chem.* **289**, 33001–33011 [CrossRef Medline](#)

## ***HilE controls dimerization and DNA binding of HilD***

66. Records, A. R. (2011) The type VI secretion system: a multipurpose delivery system with a phage-like machinery. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **24**, 751–757 [CrossRef Medline](#)
67. Ho, B. T., Dong, T. G., and Mekalanos, J. J. (2014) A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell. Host. Microbe.* **15**, 9–21 [CrossRef Medline](#)
68. Gallique, M., Bouteiller, M., and Merieau, A. (2017) The type VI secretion system: a dynamic system for bacterial communication? *Front. Microbiol.* **8**, 1454 [CrossRef Medline](#)
69. Silverman, J. M., Agnello, D. M., Zheng, H., Andrews, B. T., Li, M., Catalano, C. E., Gonen, T., and Mougous, J. D. (2013) Haemolysin coregulated protein is an exported receptor and chaperone of type VI secretion substrates. *Mol. Cell.* **51**, 584–593 [CrossRef Medline](#)
70. Folkesson, A., Löfdahl, S., and Normark, S. (2002) The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Res. Microbiol.* **153**, 537–545 [CrossRef Medline](#)
71. Oropeza, R., Sampieri, C. L., Puente, J. L., and Calva, E. (1999) Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella* Typhi: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Mol. Microbiol.* **32**, 243–252 [CrossRef Medline](#)
72. Puente, J. L., Bieber, D., Ramer, S. W., Murray, W., and Schoolnik, G. K. (1996) The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol. Microbiol.* **20**, 87–100 [CrossRef Medline](#)
73. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., and Higgins, D. G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539 [Medline](#)

**The Hcp-like protein Hile inhibits homodimerization and DNA binding of the virulence-associated transcriptional regulator HilD in *Salmonella***

Claudia C. Paredes-Amaya, Gilberto Valdés-García, Víctor R. Juárez-González, Enrique Rudiño-Piñera and Víctor H. Bustamante

*J. Biol. Chem.* 2018, 293:6578-6592.

doi: 10.1074/jbc.RA117.001421 originally published online March 13, 2018

---

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.RA117.001421](https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001421)

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 73 references, 33 of which can be accessed free at <http://www.jbc.org/content/293/17/6578.full.html#ref-list-1>

## **The Hcp-like protein HilE inhibits homodimerization and DNA binding of the virulence-associated transcriptional regulator HilD in *Salmonella***

Claudia C. Paredes-Amaya<sup>1</sup>, Gilberto Valdés-García<sup>2</sup>, Víctor R. Juárez-González<sup>2</sup>, Enrique Rudiño-Piñera<sup>2</sup> and Víctor H. Bustamante<sup>1\*</sup>

From the <sup>1</sup>Departamento de Microbiología Molecular, <sup>2</sup>Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, 62210, México.

Running title: *HilE controls dimerization and DNA binding of HilD*

\*To whom correspondence should be addressed: Víctor H. Bustamante, Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Telephone: (52) 777-329-1627. Fax: (52) 777-313-8673. E-mail address: [victor@ibt.unam.mx](mailto:victor@ibt.unam.mx)

### **Supporting information**

Table S1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Table S2. Primers used in this study

Figure S1. Gel filtration chromatography of MBP-HilD

Figure S2. The *hile* gene is located in a genomic island of *S. Typhimurium* and *S. bongori* that is absent in *E. coli* K-12

Supplementary references

Table S1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Genotype or description	Reference or source
<b>Strains</b>		
<i>S. Typhimurium</i> strains		
SL1344	Wild type; <i>xyl hisG rpsL</i> ; Sm <sup>R</sup>	(1)
14028s	Wild type	ATCC
JPTM5	$\Delta$ <i>hilD::kan</i>	(2)
<i>E. coli</i> K-12 strains		
DH5 $\alpha$	Laboratory strain	Invitrogen
SU101	Reporter strain of the LexA-based genetic system for homodimerization assays; Kan <sup>R</sup>	(3)
SU202	Reporter strain of the LexA-based genetic system for heterodimerization assays; Kan <sup>R</sup>	(3)
BL21/DE3	Strain for expression of recombinant protein	Invitrogen
MC4100	Cloning strain	(4)
<b>Plasmids</b>		
pSR658	Vector expressing LexA <sub>DBDwt</sub> for homodimerization assays; Tc <sup>R</sup>	(5)
pSR658-HilD1	pSR658 derivative expressing LexA <sub>DBDwt</sub> -HilD <sub>1-309</sub> ; Tc <sup>R</sup>	This study
pSR658-HilD2	pSR658 derivative expressing LexA <sub>DBDwt</sub> -HilD <sub>1-130</sub> ; Tc <sup>R</sup>	This study
pSR658-HilD3	pSR658 derivative expressing LexA <sub>DBDwt</sub> -HilD <sub>130-309</sub> ; Tc <sup>R</sup>	This study
pSR658-HilD4	pSR658 derivative expressing the LexA <sub>DBDwt</sub> -HilD <sub>1-220</sub> ; Tc <sup>R</sup>	This study
pSR658-HilD5	pSR658 derivative expressing the LexA <sub>DBDwt</sub> -HilD <sub>221-309</sub> ; Tc <sup>R</sup>	This study
pSR658-HilD6	pSR658 derivative expressing the LexA <sub>DBDwt</sub> -LZ-HilD <sub>221-309</sub> ; Tc <sup>R</sup>	This study
pSR658-HNS	pSR658 derivative expressing LexA <sub>DBDwt</sub> -H-NS; Tc <sup>R</sup>	(6)
pSR659	Vector expressing LexA <sub>DBDmut</sub> for heterodimerization assays; Ap <sup>R</sup>	(5)
pSR659-HilE1	pSR659 derivative expressing the LexA <sub>DBDmut</sub> -HilE fusion; Ap <sup>R</sup>	This study
pMAL-c2x	Expressing vector for constructing Maltose binding protein (MBP) fusions, <i>lac</i> promoter; Ap <sup>R</sup>	New England Biolabs
pMAL-HilD1	pMAL-c2x derivative expressing MBP-HilD fusion protein; Ap <sup>R</sup>	(2)
pMPM-A6 $\Omega$	Cloning vector p15A derivative low-copy-number, <i>ara</i> promoter; Ap <sup>R</sup>	(7)

pA6-HilE1	pMPM-A6Ω derivative expressing HilE; Ap <sup>R</sup>	This study
pMPM-K6Ω	Cloning vector p15A derivative low-copy-number, <i>ara</i> promoter; Kan <sup>R</sup>	(7)
pK6-HilE1	pMPM-K6Ω derivative expressing HilE; Kan <sup>R</sup>	This study
pUT18C-zip	Vector expressing 35 amino acids of the leucine zipper motif from GCN4 fused in frame with the T18 fragment of CyA; Ap <sup>R</sup>	Euromedex
pET32b(+)	Expressing vector for constructing Thioredoxin (Trx) fusions, T7 promoter; Ap <sup>R</sup>	Novagen
pET32-HilE	pET32b(+) derivative expressing Trx-HilE; Ap <sup>R</sup>	This study
pBAD-HilD1	pBADMycHis derivative expressing HilD-MycHis; Ap <sup>R</sup>	(6)
philA-cat1	pKK232-8 derivative expressing a <i>hila-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides - 410 to + 446	(2)

Ap<sup>R</sup>, ampicillin resistance; Sm<sup>R</sup> streptomycin resistance; Kan<sup>R</sup>, kanamycin resistance; Tc<sup>R</sup>, tetracycline resistance.

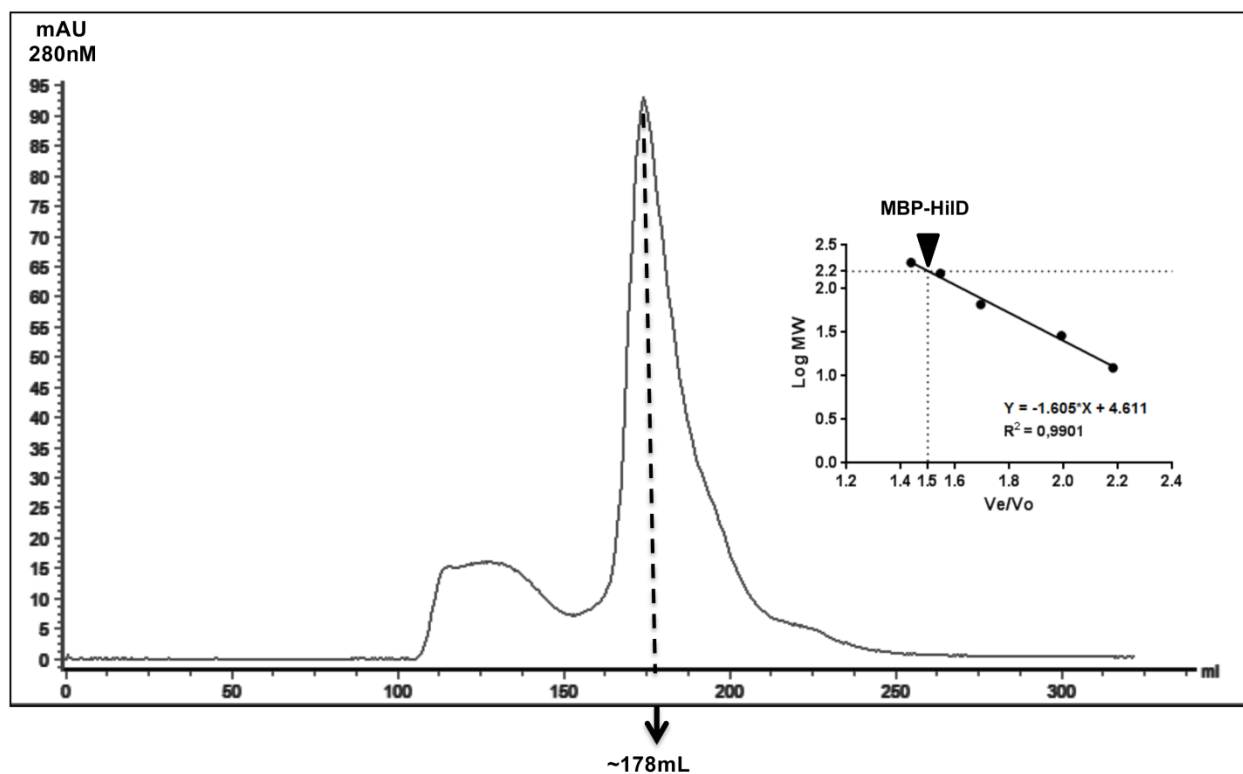


Table S2. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')	Target gene	RE
HilD-SacI	GAT <u>GAG CTC</u> GAA AAT GTA ACC TTT GTA AGT AAT AG	<i>hilD</i>	SacI
HilDexR-PstI	TCC <u>CTG CAG AAC</u> AAT GAT ATT GAA TAG C	<i>hilD</i>	PstI
HilD130-5'	CCC ACA <u>GAG CTC</u> GCG CAG AAG ATC TTC TAT ACG	<i>hilD</i>	SacI
HilD-130	ATA GAA <u>CTG CAG</u> TTA CGC TTT CTC TGT GGG TAC CG	<i>hilD</i>	PstI
HilD-220	AAG CTT <u>CTG CAG</u> TTA ACT GGG TGA CGA AGA TAT AAT G	<i>hilD</i>	PstI
HilD-221	TCG TCA <u>GAG CTC</u> AGA CAG TGG AAG CTT ACG GAT G	<i>hilD</i>	SacI
LZ-F	GTA <u>CTC GAG CAG</u> CGT ATG AAA CAG CTG GAA G	<i>gcn4*</i>	XhoI
LZ-HilD221F	GAA AAA ACT GGT GGG TGA ACG TAG ACA GTG GAA GCT TAC GGA TG	<i>gcn4*</i>	
HilD221LZR	CAT CCG TAA GCT TCC ACT GTC TAC GTT CAC CCA CCA GTT TTT TC	<i>hilD</i>	
HilE-SacI	GGG <u>GAG CTC</u> GAC GCC ATC TAT TTA AAA CTG G	<i>hilE</i>	SacI
HilE- HindIII-3'	TCC <u>GCA AGC TTG</u> TTT TGT CC	<i>hilE</i>	HindIII
HilE-NcoI-2	GAG GGG <u>CCA TGG</u> ACG CCA TCT ATT TAA AAC TGG	<i>hilE</i>	NcoI
HilE-His6	CCC <u>AAG CTT</u> TCC TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG TCG CCA CAG CGC CTG TCG G	<i>hilE</i>	HindIII
HilE-PUT-BamHI	ATA <u>ACG GAT CCG</u> AGG GCC ACG CGT TAT CGC	<i>hilE</i>	BamHI
HilCRR-F	GGA ATG TAA TTA TTG GCT ATA ATA ATA AAA AAA TCG GAT TTA AAT CAT CT	<i>hilC</i>	
HilCRR-R	GAG ATG ATT TAA ATC CGA TTT TTT TAT TAT TAT AGC CAA TAA TTA CAT TC	<i>hilC</i>	

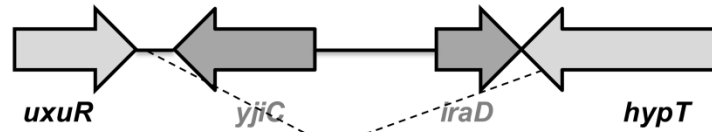
RE, restriction enzyme for which a site was generated in the primer. Underlined letters indicate the respective restriction-enzyme site in the primer. \* *gcn4* carried by pUT18C-zip (Table 1).



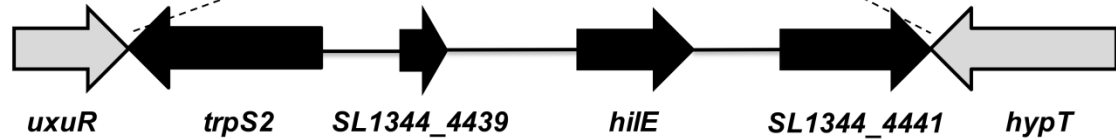


**Figure S1. Gel filtration chromatography of MBP-HiID.** Chromatogram showing the elution profile of MBP-HiID, fractionated on a Superdex 200 column (HiLoad™ 16/60), in a buffer containing 200 mM Tris-HCl pH 8.0 and 150 mM NaCl. On the right, a five-point calibration curve was performed using the Gel Filtration Molecular Weight Markers Kit (Sigma-Aldrich). The arrow indicates the relative molecular mass of MBP-HiID calculated by comparison with the five-point calibration curve.

*E. coli* MG1655

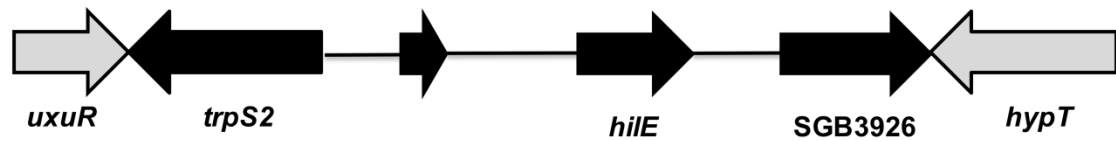


*S. Typhimurium* SL1344



% G + C	54.6	52.9	33.3	49.2	55.6	52.3
---------	------	------	------	------	------	------

*S. bongori* NCTC 12419



**Figure S2. The *hilE* gene is located in a genomic island of *S. Typhimurium* and *S. bongori* that is absent in *E. coli* K-12.** Schematic view of the DNA region between the *uxuR* and *hypT* ancestral genes in *E. coli* K-12 MG1655, *S. Typhimurium* SL1344 and *S. bongori* NCTC 12419. The *hilE* gene is present in *S. Typhimurium* and *S. bongori*, but not in *E. coli* K-12. The *trpS2*, *SL1344\_4438* and *SL1344\_4431* genes encode for a tryptophanyl-tRNA synthetase, a hypothetical protein and a putative aspartate-racemase, respectively. The G + C content for each of the *S. Typhimurium* SL1344 genes is shown.

## Supplementary references

1. Hoiseth, S. K., and Stocker, B. A. (1981) Aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**, 238-239
2. Bustamante, V. H., Martinez, L. C., Santana, F. J., Knodler, L. A., Steele-Mortimer, O., and Puente, J. L. (2008) HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **105**, 14591-14596
3. Dmitrova, M., Younes-Cauet, G., Oertel-Buchheit, P., Porte, D., Schnarr, M., and Granger-Schnarr, M. (1998) A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **257**, 205-212
4. Casadaban, M. J. (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**, 541-555
5. Daines, D. A., and Silver, R. P. (2000) Evidence for multimerization of neu proteins involved in polysialic acid synthesis in *Escherichia coli* K1 using improved LexA-based vectors. *J. Bacteriol.* **182**, 5267-5270
6. Martinez, L. C., Yakhnin, H., Camacho, M. I., Georgellis, D., Babitzke, P., Puente, J. L., and 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**, 1637-1656
7. Mayer, M. P. (1995) A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**, 41-46