



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

“Participación del clúster genético STY0034-STY0041 en la resistencia a sales biliares en *Salmonella enterica* serovar Typhi”

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:
ING. MARÍA LORENA ZAVALA GARCIA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. ISMAEL HERNÁNDEZ LUCAS, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM**

**COMITÉ TUTOR:
DRA. MARÍA DEL ROSARIO MORALES ESPINOZA, FACULTAD DE MEDICINA-UNAM
DR. JUAN MIRANDA RÍOS, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS-UNAM**

CIUDADE DE MÉXICO, MAYO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

“Participación del clúster genético STY0034-STY0041 en la resistencia a sales biliares en *Salmonella enterica* serovar Typhi”

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:
ING. MARÍA LORENA ZAVALA GARCIA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. ISMAEL HERNÁNDEZ LUCAS, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM**

**COMITÉ TUTOR:
DRA. MARÍA DEL ROSARIO MORALES ESPINOZA, FACULTAD DE MEDICINA-UNAM
DR. JUAN MIRANDA RÍOS, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS-UNAM**

CIUDADE DE MÉXICO, MAYO 2019

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

OFICIO FCIE/DAIP/0311/2019

ASUNTO: **Oficio de Jurado**


M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e.

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **8 de abril de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la alumna **ZAVALA GARCÍA MARÍA LORENA** con número de cuenta **515015328** con la tesis titulada "**Participación del clúster genético STY0034-STY0041 en la resistencia a sales biliares en *Salmonella enterica* serovar Typhi**", realizada bajo la dirección del **DR. ISMAEL HERNÁNDEZ LUCAS**:

Presidente:	DR. ALEJANDRO GARCÍA DE LOS SANTOS
Vocal:	DR. JUAN XICOHTENCATL CORTES
Secretario:	DR. JUAN MIRANDA RIOS
Suplente:	DR. HIPOLITO ANGEL MANJARREZ HERNÁNDEZ
Suplente:	DRA. BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 9 de abril de 2019


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/VMVA/ASR/grf*

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para desarrollar este proyecto de Maestría.

Al Dr. Ismael Hernández Lucas por su tiempo, dedicación, apoyo y dirección para realizar este trabajo.

A la Dra. María del Rosario Morales Espinosa por formar parte de mi comité tutorial, por sus consejos y apoyo en cada examen.

Al Dr. Juan Miranda Ríos por también formar parte de mi comité tutorial, por todas esas observaciones hacia mi proyecto y por ser parte de mi jurado.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A MI JURADO:

Al Dr. Alejandro García de los Santos por ser presidente de mi jurado.

Al Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo.

Al Dr. Hipólito Ángel Manjarrez Hernández.

Al Dr. Juan Xicohtencatl Cortes

LAB CALVA/PUENTE:

Al Dr. Edmundo Calva y al Dr. José Luis Puente por permitirme ser parte de su laboratorio.

A la Dra. Alejandra Vázquez por su colaboración en este proyecto.

Al M.C, Marcos Fernández y Biól. Francisco Javier Santana E, por brindarme material y conocimiento en todo este periodo.

A la Dra. Lucia Perezgasga por el apoyo académico brindado.

A Isaac Olivar Casique por revisar esta tesis.

A MI FAMILIA

A mi madre Isabel por su amor, por su apoyo en cada etapa de mi vida, por creer en mí, por estar en cada momento de felicidad y de tristeza. Por ayudarme en mi crecimiento profesional.

A mi padre Narciso por su apoyo económico, a pesar de la distancia siempre contribuyo en mi formación académica.

A mi hermana Lucy por siempre creer en mí y motivarme para realizar cada actividad, por ser el ejemplo de una gran mujer que no se da por vencida fácilmente a pesar de todos esos malos momentos de la vida y mostrarme que se puede seguir adelante. Y a mi hermano Jesús por su cariño, por apoyarme desde la distancia.

Agradezco a mi familia iniciando por mis abuelos Francisco y Zenaida, mis tíos Herlinda, Francisco, Inés, Antonio, María Elena, Eva, Margarita y Nicolás por su cariño y comprensión, además de siempre recibirme con los brazos abiertos y una sonrisa en su casa.

A Erick por apoyarme en el inicio de esta etapa y continuar hasta el final, por su ayuda en esos malos momentos, por su cariño y comprensión, por todo lo que hizo para que siempre llegara bien a mi destino.

A LUCAS TEAM:

Al Dr. Ismael por sus consejos, amistad, comprensión, por su paciencia y sobre todo por su apoyo en lo académico y lo personal durante todo este tiempo.

A la Dra. Liliana Medina por compartirme sus conocimientos, por cada uno de sus consejos, por siempre tomarse el tiempo para explicarme cada técnica, por ayudarme a resolver mis dudas y claro por su AMISTAD, aunque nunca voy a poder agradecerle lo suficiente, por jamás dejarme sola y porque cuando me sentí perdida me ayudo a retomar el camino.

Al M.C. Javier Esteban por tus consejos en las técnicas, por hacer más divertida esta etapa y compartir mesa, también por facilitar esos viajes al DF.

Al M.C. Víctor Osio y la Lic. Abigail Luviano por hacer más divertida la maestría, por hacer más fácil todos esos buenos y malos momentos que vivíamos cada día, claro también por esos buenos memes.

A la Dra. Alejandra Vázquez por su valiosa amistad y hospitalidad brindada.

A los nuevos amigos que encontré durante este periodo de mi vida: Emilio, Claudia, Víctor CCG y Crispín, gracias por su amistad y que así continúe por mucho tiempo.

A doña Rebe y a Mario por facilitarme materiales y algunos reactivos, además de su amistad y buena convivencia en el laboratorio.

A doña Aurelia (Au) por proporcionarme una rica comida y una agradable convivencia.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.2. Género <i>Salmonella</i>	3
2.3. Ciclo de Infección de <i>S. Typhi</i>	4
2.4. Resistencia a sales biliares en <i>Salmonella</i>	6
3. ANTECEDENTES.....	8
4. OBJETIVOS.....	11
4.2. Objetivo general.....	11
4.3. Objetivos particulares	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS	12
5.2. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio	12
5.3. Plásmido utilizado en este estudio	13
5.4. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	15
5.5. Medios de cultivo.....	16
5.6. Manipulación de ADN.....	16
5.7. Construcción de cepas mutantes	16
5.8. Curvas de crecimiento en medio LB suplementado con 5% de deoxicolato de sodio	17
5.9. Complementaciones.....	17
5.10. Purificación y electroforesis de proteínas de membrana externa.....	18
5.11. Electroforesis en gel de 2 dimensiones de proteínas de membrana externa	19
5.12. Construcciones de fusiones transcripcionales al gen reportero <i>cat</i>	20
5.13. Ensayos de Actividad CAT.....	20
6. RESULTADOS.....	22
6.2. STY0036 (<i>ltrR</i>) participan en la resistencia a deoxicolato de sodio.....	22
6.3. LtrR1 y LtrR2 son requeridos para sintetizar los niveles necesarios de la porina OmpC en MM-N	23
6.4. El clúster STY0034-STY0041 está involucrado en la resistencia a sales biliares. 25	
6.5. Restablecimiento de la síntesis de proteínas de membrana externa de cada mutante del clúster STY0034-STY0041	27
6.6. Resistencia a deoxicolato de sodio de las mutantes del clúster STY0034-STY0041 complementas.....	31
6.7. Mutantes en cada uno de los genes del clúster STY0034-STY0041 afectan la expresión de <i>ompR</i>	33

6.8. HN-S regula negativamente la expresión de STY0035	34
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	39
8. PERSPECTIVAS	42
9. REFERENCIAS	43

ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1 Anclaje e internalización de *Salmonella* en una célula huésped. Después de la unión a la superficie de la célula huésped, *Salmonella* puede expresar un sistema de secreción tipo III que facilita la captación e invasión endotelial a través de la translocación de proteínas efectoras de la célula bacteriana al citosol de la célula huésped (Kaur J y Jain S, 2012). 5
- Fig. 2 Patogénesis molecular de *Salmonella* Typhi. Esta bacteria usa una variedad de factores de virulencia durante la infección (Johnson R *et al.*, 2018)..... 6
- Fig. 3 Los ácidos biliares sintetizados en el hígado y almacenados en la vesícula biliar entran en el intestino delgado a través del duodeno, donde alcanzan concentraciones milimolares (Foley M *et al.*, 2019)..... 8
- Fig. 4A) Perfil de proteínas de membrana externa de las cepas *S. Typhi* IMSS-1 wt, *ltrR* Δ P1 y *ltrR* Δ P2 en MM-N. B) Curva de crecimiento en LB + 5% de deoxicolato de sodio de las cepas *S. Typhi* IMSS-1 wt, *ltrR* Δ P1 y *ltrR* Δ P2. Con flechas se indican las proteínas de membrana en kDa. 22
- Fig. 5. Gel de 2 Dimensiones de las cepas IMSS-1 wt, *ltrR* Δ P2 y *ltrR* Δ P1 en MM-N. Con una flecha y número (1-10) se marcan los spots que corresponde a OmpC (6, 8, 9 y 10) y OmpF (1, 2, 3, 4, 5 y 7). 24
- Fig 6. Representación esquemática del clúster STY0034-STY0041. La figura incluye el porcentaje de Citocina-Guanina. 25
- Fig 7. Curva de crecimiento de las cepas *S. Typhi* IMSS-1, Δ *ltrR*, Δ STY0034, Δ STY0035, Δ STY0038, Δ STY0039, Δ STY0040 y Δ STY0041 en medio LB suplementado con deoxicolato de sodio 5%..... 26
- Fig 8. Perfil de proteínas de membrana externa de las mutantes del clúster STY0034-STY0041 en MM-N a un DO₅₉₅ de 0.6. Como control positivo se utilizó la cepa *S. Typhi* IMSS-1 y la cepa Δ *ltrR* como control negativo. Con las flechas se indican las porinas más abundantes OmpC, OmpF y OmpA. MPM: Marcador de peso molecular en kDa..... 27

Fig 9. Perfil de proteínas de membrana externa de las mutantes del clúster STY0034-STY0041 complementadas con el plásmido pACY/ompR en MM-N. Como controles se utilizaron las cepas IMSS-1 wt, $\Delta ompR$ y $\Delta ompR/pACY/ompR$. Con flechas se indican las proteínas OmpC, OmpF y OmpA. MPM: marcador de peso molecular en kDa..... 28

Fig 10. Perfiles de proteínas de membrana externa de las mutantes del clúster STY0034-STY0041 complementadas con el plásmido pACY/ompR y el vector pWSK29 o pKK232-8 conteniendo el gen correspondiente para complementar las cepas mutantes. Con flechas se indican las proteínas de membrana externa OmpC, OmpF y OmpA. Cada una de las muestras fue colectada a una DO_{595nm} de 0.6 en MM-N. MPM: marcador de peso molecular en kDa..... 30

Fig 11. Curva de crecimiento en medio LB suplementado con 5% de deoxicolato de sodio de las cepas: A) $\Delta STY0035$, B) $\Delta STY0038$, C) $\Delta STY0039$, D) $\Delta STY0040$ y E) $\Delta STY0041$ complementadas con los plásmidos pACY/ompR, pACY/ompR+pWSK29 conteniendo el gen correspondiente a cada mutación o pACY/ompR+pKK232-8 albergando el gen correspondiente para complementar de manera individual cada mutante. Como control se utilizó la cepa *S. Typhi* IMSS-1..... 32

Fig 12. Actividad transcripcional del promotor 2 (A) y promotor 1 (B) de *ompR* en las cepas *S. Typhi* IMSS-1, $\Delta ltrR$, $\Delta STY0034$, $\Delta STY0035$, $\Delta STY0038$, $\Delta STY0039$, $\Delta STY0040$ y $\Delta STY0041$, cultivadas en MM-N a DO_{595} 0.6..... 34

Fig. 13. Actividad específica CAT de la fusión pKK8/STY0035 en una cepa IMSS-1 WT (barras blancas) y en la cepa mutante Δhns (barras negras) en MM-N..... 35

Fig 14. Comparación de los perfiles de expresión de las zonas regulatorias de los genes STY0034, STY0035, STY0036 (*ltrR*), STY0038, STY0039, STY0040 y STY0041 en MM-N y LB+ 5% de deoxicolato a una DO_{595} 0.6. Se muestra una mayor actividad transcripcional en medio mínimo obteniéndose diferentes patrones de expresión. 36

Fig. 15. Perfil transcripcional de los genes STY0034 (A), STY0035 (B) y *ltrR* (C) en MM-N en pH 6.0 y 7.5..... 38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas.	12
Tabla 2. Plásmidos utilizados y sus características.	13
Tabla 3. Oligos utilizados y su secuencia.	15
Tabla 4. Proteínas de membrana externas expresadas en MM-N. Se indica el número de spot y la densidad óptica de cada porina en las cepas IMSS-1 wt, <i>ltrRΔP1</i> y <i>ltrRΔP2</i>	24

1. RESUMEN

Salmonella Typhi el agente causal de la fiebre tifoidea, puede sobrevivir en el intestino y en la vesícula biliar. En este trabajo determinamos que el gen *ltrR* codifica dos proteínas, LtrR1 y LtrR2, ambas involucradas en la transcripción de *ompC*. El producto de este gen confiere la resistencia a la sal biliar deoxicolato de sodio. *ltrR* se encuentra ubicado dentro del clúster genético STY0034-STY0041, mutaciones individuales en cada uno de estos genes causa sensibilidad a deoxicolato de sodio. En cuanto a la regulación del clúster STY0034-STY0041 establecimos que STY0035 y STY0036 (*ltrR*) se encuentran ligados funcionalmente ya que ambas mutantes no crecen en deoxicolato de sodio, estos genes son regulados por pH en medio mínimo N y el regulador global H-NS controla de manera negativa cada uno de sus promotores. |1Estudios futuros son necesarios para establecer la función específica de cada uno de los genes descritos en esta tesis y poder generar un modelo sobre el mecanismo de resistencia a sales biliares en *S. Typhi*.

ABSTRACT

Salmonella Typhi the causative agent of typhoid fever is able to survive in the intestine and in the gallbladder. In this work we determined that the *ltrR* gene encodes two proteins: LtrR1 and LtrR2, both proteins are involved indirectly in the regulation of *ompC*, and the product of this gene has a role in bile resistance. *ltrR* is located within the STY0034-STY0041 cluster, individual mutations in each one of these genes shows their role in bile resistance. Regulatory studies of STY0034-STY0041 establish that STY0035 and STY0036 (*ltrR*) are functionally linked, since both genes are regulated by pH and the global regulatory protein H-NS represses their expression. Future research is needed to define the specific role of each of the genes described in this work, this is fundamental to establish a model for bile resistance in *S. Typhi*.

2. INTRODUCCIÓN

2.2. Género *Salmonella*

El género *Salmonella* constituye un grupo heterogéneo de Gamma proteobacterias, son bacilos gram negativos, móviles, anaerobios facultativos, fermentan la glucosa y son oxidasa e indol negativos (Framer, 1999). El género *Salmonella* está dividido en dos especies: *Salmonella bongori* (*S. bongori*) y *Salmonella entérica* (*S. enterica*). Esta última se divide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae*. La taxonomía actual se basa en el esquema de White-Kauffmann que utiliza los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y ocasionalmente capsular (Vi), para clasificar a los más de 2500 serovares que se conocen hasta el momento (Grimont y Weill, 2007). La especie *S. enterica* se compone por bacterias patógenas que tienen la habilidad de infectar un amplio rango de animales incluyendo al ser humano y causar enfermedades como la fiebre tifoidea.

Salmonella enterica serovar Typhi (*S. Typhi*) es el agente causal de la fiebre tifoidea. Esta enfermedad es un problema de salud mundial ya que afecta a países en vía de desarrollo con una infraestructura limitada de salud pública (Crump y Mintz, 2010). Durante el 2000 se estimaron 21 millones de contagios por *S. Typhi* ocasionando más de 200 000 muertes por año (Crump *et al.*, 2004).

La infección por esta bacteria ocurre a través del consumo de agua y alimentos contaminados con heces. Los síntomas de la fiebre tifoidea se desarrollan entre los 7 y 14 días después de la ingestión del patógeno. Los pacientes presentan escalofríos, dolor de cabeza, náuseas, malestar abdominal, tos seca, mialgia, hepatomegalia y esplenomegalia. La fiebre aumenta gradualmente hasta alcanzar 39 o 40°C, algunas de las complicaciones de la tifoidea son perforación intestinal, alteraciones neurológicas como encefalopatía y a nivel cardiovascular ocasiona miocarditis; finalmente puede causar la muerte (Parry *et al.*, 2002).

S. Typhi no desencadena una respuesta inflamatoria temprana en el intestino. Este patógeno evita esta manifestación y utiliza un enfoque más sutil para invadir y colonizar diferentes órganos del cuerpo como el bazo, hígado, vesícula biliar y médula ósea.

2.3. Ciclo de Infección de *S. Typhi*

La infección por *S. Typhi* inicia con la ingestión de agua o comida contaminada, la cantidad de bacterias necesarias para generar un daño oscila entre mil y 1 millón de microorganismos, el periodo de incubación es de 7 a 14 días (Snyder, 1970).

El primer obstáculo para la colonización del tracto digestivo es el pH ácido del estómago. Para sobrevivir en esta condición de estrés, *Salmonella* activa la respuesta a tolerancia a ácido (ATR) (Foster y Hall, 1991; García-del Portillo *et al.*, 1993). Los elementos genéticos que necesita para resistir al pH ácido son genes de respuesta a daño de membrana celular (*aas*, *pbpA* y *cld*), así como reguladores transcripcionales (RpoS, Fur, OmpR, PhoP) (Lee *et al.*, 1995; Hall y Foster, 1996; Bearson *et al.*, 1998; Bang *et al.*, 2000). Después de atravesar exitosamente el estómago, este patógeno se dirige hacia el intestino.

El microorganismo ingresa al intestino delgado, en la región distal del íleon. Una vez ahí la bacteria puede invadir células epiteliales, células M y/o células dendríticas (Fabrega y Vila, 2013). Las células epiteliales intestinales son células no fagocíticas, sin embargo, *Salmonella* tiene la capacidad de invadirlas utilizando el Sistema de Secreción Tipo III (SST3) ubicado en la Isla de Patogenicidad 1 (SPI-1) (Galán y Curtiss, 1989; Galán, 2001).

El blanco principal de *Salmonella* son las células M, la adherencia a esta célula es promovido por proteínas denominadas fimbrias (Jones *et al.* 1994; Bäumler *et al.* 1996). Las células M se sitúan en la parte superior de los folículos linfoides de las placas de Peyer; durante el proceso de invasión *Salmonella* induce reajustes en el citoesqueleto dando lugar a la formación de ondulamientos (ruffling) de la membrana celular permitiendo rodear y conducir a la endocitosis del patógeno (Kohbata *et al.* 1986). Se reconocen varias proteínas

efectoras de la SPI-1 involucradas en los rearrreglos del citoesqueleto: SipA, SopE, SopE2 y SopB (Galán, 1996). *Salmonella* produce efectos citotóxicos que resultan en la destrucción de las células M y la invasión de enterocitos adyacentes tanto por la cara apical como por la basolateral (Fig. 1).

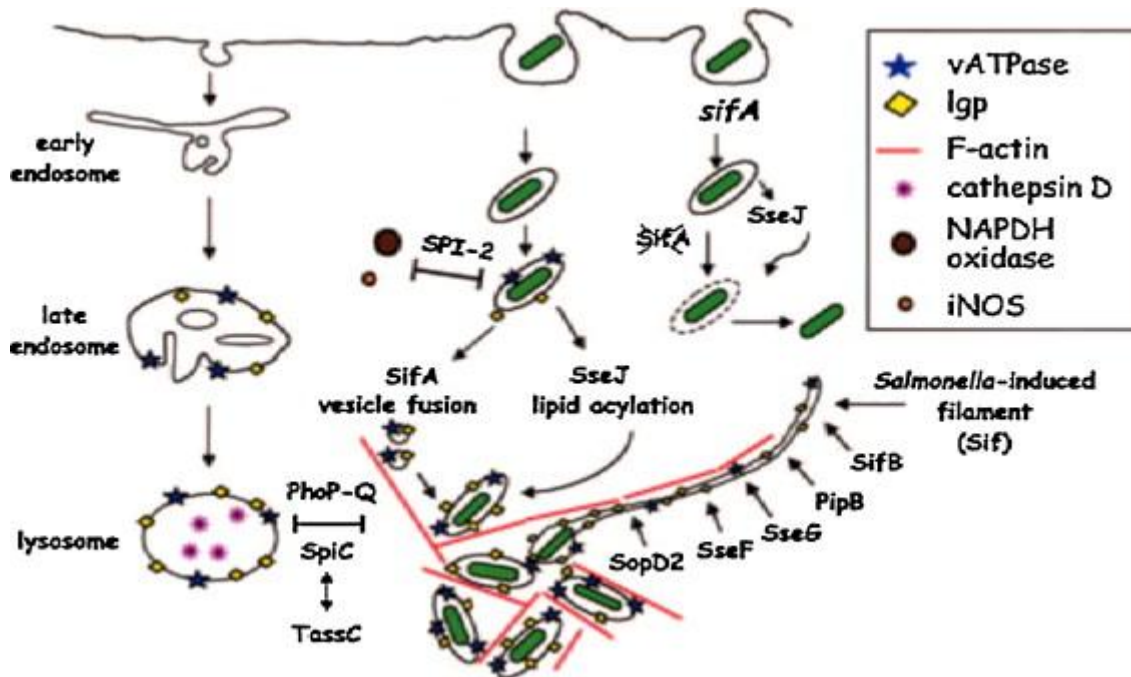


Fig. 1 Anclaje e internalización de *Salmonella* en una célula huésped. Después de la unión a la superficie de la célula huésped, *Salmonella* puede expresar un sistema de secreción tipo III que facilita la captación e invasión endotelial a través de la translocación de proteínas efectoras de la célula bacteriana al citosol de la célula huésped (Kaur J y Jain S, 2012).

Después de invadir las células epiteliales, *Salmonella* puede ser fagocitada por macrófagos e iniciar la infección sistémica. Sin embargo, en seguida de ser ingerida por la célula eucariótica, este patógeno es capaz de sobrevivir y manipular las funciones de la célula huésped por medio de proteínas efectoras que son liberadas a través del SST3 de la Isla de Patogenicidad de *Salmonella* 2 (SPI-2) (Swart y Hensel, 2012).

Salmonella es envuelta dentro de un fagosoma modificado conocido como Vacuola Contenedora de *Salmonella* (VCS), donde el patógeno puede sobrevivir y replicarse contribuyendo a la diseminación del microorganismo. Después de un periodo de adaptación de 3-4 horas, *Salmonella* tiene la capacidad de replicarse dentro de las VCS, que se

caracterizan por tener concentraciones limitadas de Mg^{2+} y Fe^{2+} además de un pH ácido, la acidificación dentro del fagosoma es necesaria para la supervivencia y replicación intracelular (Figuroa y Verdugo, 2005). Mediante los macrófagos *Salmonella* es capaz de diseminarse a hígado, bazo y vesícula biliar (Fig. 2).

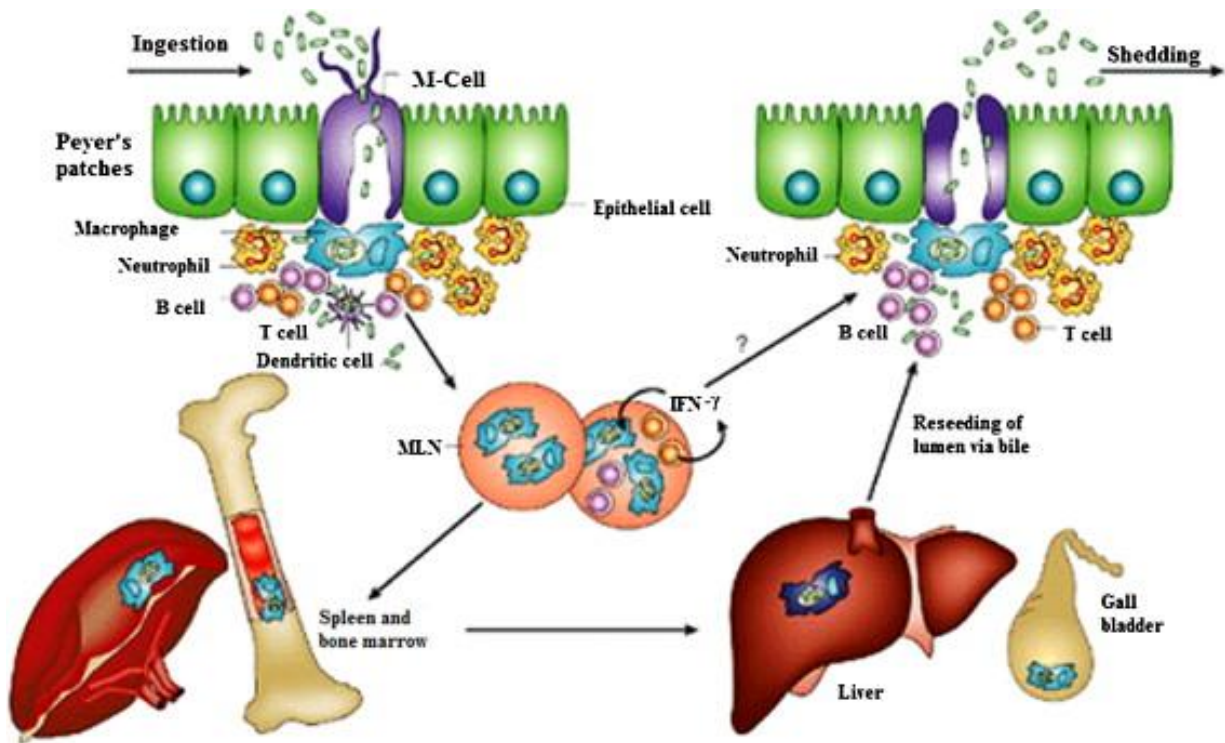


Fig. 2 Patogénesis molecular de *Salmonella* Typhi. Esta bacteria usa una variedad de factores de virulencia durante la infección (Johnson R *et al.*, 2018).

2.4. Resistencia a sales biliares en *Salmonella*

El efecto antimicrobiano de las sales biliares provoca varios mecanismos de resistencia bacteriana, incluyendo la activación de diferentes respuestas a estreses (estrés oxidativo y pH bajo) (Sokol, 1995; Lechner, 2002), también activa genes involucrados en la protección y síntesis de la membrana, así como en reparación de ADN (Kandell, 1991). Las sales biliares igualmente alteran la conformación de las proteínas, teniendo un efecto sobre su plegamiento o desnaturalizándolas (Nikaido *et al.*, 2008; Rince *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2009).

La bilis es una solución acuosa compuesta de elementos inorgánicos y orgánicos: cloro, sodio, potasio, colesterol, fosfolípidos, pigmentos, inmunoglobulina A y en la mayor parte se conforma por sales biliares (SBs). Este líquido tiene un rango de pH de 7.5-8.0, es generalmente isotónico con una osmolaridad de aproximadamente 300 mOsm/kg, los iones inorgánicos le atribuye la actividad osmótica. La principal función de la bilis es emulsificar y solubilizar lípidos ingeridos en la dieta diaria, por lo tanto, tiene un papel fundamental en la digestión de grasas. La concentración de los ácidos biliares en vesícula biliar son 300 mmol/l y cuando pasa al tracto gastrointestinal la concentración disminuye a 10 mmol/l (Hofman, 1999).

Los ácidos biliares primarios son el ácido cólico y quenodeoxycólico. Son sintetizados en el hígado a partir del colesterol (Hofmann, 1999). Metabolismo adicional en el hígado resulta en la formación de sales biliares conjugadas mediante la unión de alguno de estos dos aminoácidos glicina o taurina a la cadena lateral de estos diversos ácidos biliares. Estas sales biliares son concentradas y almacenadas en la vesícula biliar hasta que la circulación enterohepática se activa por la ingesta de alimentos (Ridlon *et al.*, 2006) (Fig. 3).

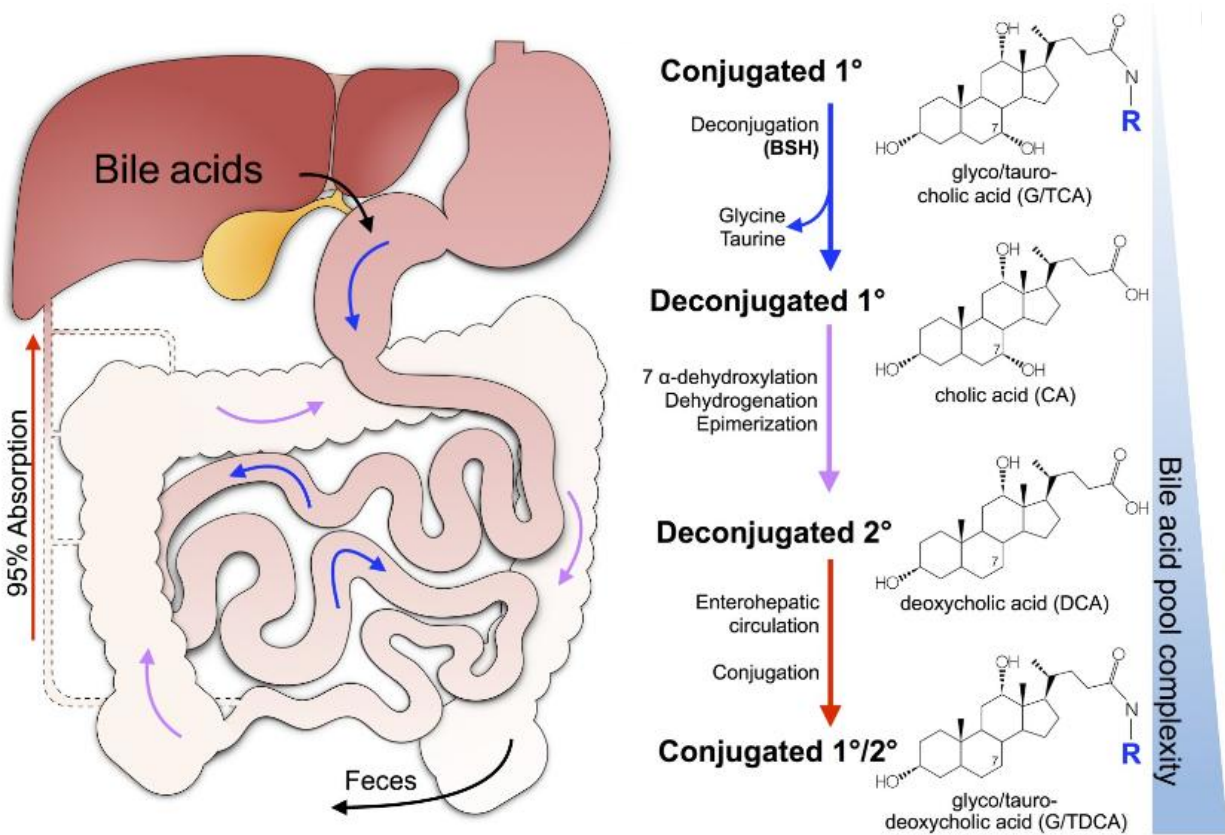


Fig. 3 Los ácidos biliares sintetizados en el hígado y almacenados en la vesícula biliar entran en el intestino delgado a través del duodeno, donde alcanzan concentraciones milimolares (Foley M *et al.*, 2019).

Además de su función en la digestión de grasas, los ácidos biliares desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la función de barrera intestinal, como agentes antimicrobianos que ayudan a determinar la composición del microbioma intestinal.

3. ANTECEDENTES

Las sales biliares son esenciales para la digestión de los lípidos, actúan como un detergente ayudando a emulsionar las grasas en el intestino delgado, otra función importante es el efecto antimicrobiano. La resistencia a sales biliares es una presión selectiva en el intestino que controla la presencia de algunos microorganismos.

Las bacterias resisten a las sales biliares a través de diferentes mecanismos que incluyen bombas de expulsión, alteración en la composición lipídica, proteica de su membrana y la

reparación de ADN (Bernstein *et al.*, 1999; Kristoffersen *et al.*, 2007; Prieto *et al.*, 2006). Las sales biliares actúan como agente antimicrobiano generando principalmente daño a nivel de membrana (Nikaido *et al.*, 2008; Rince *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2009).

Las bacterias entéricas son un grupo de microorganismos que han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir y proliferar dentro del tracto gastrointestinal. *Escherichia coli* (*E. coli*) es un patógeno entérico que ha servido como modelo para el estudio de la resistencia a sales biliares, se demostró que en presencia de ácido quenodeoxicólico y deoxicolato de sodio aumentó la expresión del gen *sula*, este gen forma parte de la respuesta SOS de la bacteria. *sula* actúa como una pequeña molécula que detiene la formación del anillo FtsZ en la división celular (Jones y Holland, 1985). Por otra parte, Bernstein *et al.* (1999) evaluaron el efecto del deoxicolato de sodio, quenodeoxicolato de sodio, ursodeoxicolato y glicolato de sodio en cepas de *E. coli* y observaron la expresión de genes involucrados en diferentes tipos de procesos biológicos como desintoxicación (*micF*, *catG*), reguladores transcripcionales (*merR*, *ada*) y metabolismo (*zwf*).

Salmonella tiene la habilidad de colonizar la vesícula biliar donde hay altas concentraciones de bilis. Esta colonización es la responsable del estado de portador crónicos asintomático infectados con *S. Typhi* que actúan como reservorio del patógeno.

En *Salmonella Typhimurium* (*S. Typhimurium*) los genes *wec* participan en la síntesis y ensamblaje del antígeno común enterobacterial (ACE), mutantes de estos genes sugieren que el ACE está involucrado en la detección de sales biliares en el intestino (Ramos *et al.*, 2003). TolC es una proteína de expulsión localizada en la membrana externa de *S. Typhimurium* y se cree que ayuda en la eliminación del deoxicolato (Prouty *et al.*, 2002). Una mutante en el sistema de transducción de señales PhoPQ incrementa la resistencia a sales biliares, sin embargo, no se conoce como el sistema de dos componentes participa en este mecanismo (Van Velkinburgh y Gunn, 1999). Recientemente en nuestro laboratorio se ha demostrado que el regulador tipo LysR LtrR (STY0036) participa en resistencia a la sal biliar deoxicolato de sodio en *S. Typhi*, LtrR activa de forma directa la expresión del

regulador OmpR y este a su vez induce la síntesis de la proteína de membrana externa OmpC en presencia de deoxicolato de sodio (Villarreal *et al.*, 2014), no obstante, los mecanismos por los cuales la bacteria detecta, metaboliza, resiste e inactiva la bilis requieren ser elucidados.

4. OBJETIVOS

4.2. Objetivo general

- Determinar la función del clúster STY0034-STY0041 en la resistencia a sales biliares en *S. Typhi*.

4.3. Objetivos particulares

- Generar mutantes en los genes STY0034, STY0035, STY0036 STY0038, STY0039, STY0040 y STY0041.
- Evaluar el efecto de estas mutaciones en la resistencia a la sal biliar deoxicolato de sodio.
- Complementar las mutantes generadas con su respectivo gen silvestre.
- Estudiar la regulación genética del clúster STY0034-STY0041.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio

En la tabla 1 se enlistan las cepas utilizadas y sus características.

Tabla 1. Cepas bacterianas.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E.coli</i> DH5 α	Φ 80d/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17 (rk-mk+) phoA</i> <i>suE44</i> λ -thi-1 <i>gyrA96 relA!</i> <i>Nal</i> ^R	Gibco BRL
<i>S. enterica</i> serovar Typhi		
IMSS-1 IMSS-1 Δ STY0036 (Δ <i>ltrR</i>)	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi 9.12, d, serotipo Vi. Aislado clínico mexicano. IMSS-1 Δ STY0036	Puente <i>et al.</i> , 1987 Villarreal <i>et al.</i> , 2014.
IMSS-1 Δ <i>ltrRP1</i>	Se eliminó la caja -10 del promotor 1 de <i>ltrR</i>	
IMSS-1 Δ <i>ltrRP2</i>	Se eliminó la caja -10 del promotor 2 de <i>ltrR</i>	
IMSS-1 Δ <i>ompR</i>	IMSS-1 Δ <i>ompR</i>	Villarreal <i>et al.</i> , 2014.
IMSS-1 Δ STY0034	IMSS-1 Δ STY0034	Este trabajo.
IMSS-1 Δ STY0035	IMSS-1 Δ STY0035	Este trabajo.
IMSS-1 Δ STY0038	IMSS-1 Δ STY0038	Este trabajo.
IMSS-1 Δ STY0039	IMSS-1 Δ STY0039	Este trabajo.
IMSS-1 Δ STY0040	IMSS-1 Δ STY0040	Este trabajo.
IMSS-1 Δ STY0041	IMSS-1 Δ STY0041	Este trabajo.
IMSS-1 Δ <i>ltrR</i> +pACY/ <i>ompR</i>	IMSS-1 Δ <i>ltrR</i> con el plásmido pACY/ <i>ompR</i> . Cm ^R	
IMSS-1 Δ STY0034+pACY/ <i>ompR</i>	IMSS-1 Δ STY0034 con el plásmido pACY/ <i>ompR</i> . Cm ^R	Este trabajo.
IMSS-1 Δ STY0035+pACY/ <i>ompR</i>	IMSS-1 Δ STY0035 con el plásmido pACY/ <i>ompR</i> . Cm ^R	Este trabajo.
IMSS-1 Δ STY0038+pACY/ <i>ompR</i>	IMSS-1 Δ STY0038 con el plásmido pACY/ <i>ompR</i> . Cm ^R	Este trabajo.
IMSS-1 Δ STY0039+pACY/ <i>ompR</i>	IMSS-1 Δ STY0039 con el plásmido pACY/ <i>ompR</i> . Cm ^R	Este trabajo.
IMSS-1 Δ STY0040+pACY/ <i>ompR</i>	IMSS-1 Δ STY0040 con el plásmido pACY/ <i>ompR</i> . Cm ^R	Este trabajo.
IMSS-1 Δ STY0041+pACY/ <i>ompR</i>	IMSS-1 Δ STY0041 con el plásmido pACY/ <i>ompR</i> . Cm ^R	Este trabajo.
IMSS-1 Δ STY0035+pACY/ <i>ompR</i> +pWSK/STY0035	IMSS-1 Δ STY0035 con los plásmidos pACY/ <i>ompR</i> y pWSK/STY0035. Cm ^R , Ap ^R	Este trabajo.
IMSS-1 Δ STY0038+pACY/ <i>ompR</i> +pWSK/STY0038	IMSS-1 Δ STY0038 con los plásmidos pACY/ <i>ompR</i> y pWSK/STY0038. Cm ^R , Ap ^R	Este trabajo.

IMSS-1 ΔSTY0039+pACY/ <i>ompR</i> +pWSK/STY0039	IMSS-1 ΔSTY0039 con los plásmidos pACY/ <i>ompR</i> y pWSK/STY0039. Cm ^R , Ap ^R	Este trabajo.
IMSS-1 ΔSTY0040+pACY/ <i>ompR</i> +pWSK/STY0040-STY0041	IMSS-1 ΔSTY0040 con los plásmidos pACY/ <i>ompR</i> y pWSK/STY0040-STY0041. Cm ^R , Ap ^R	Este trabajo.
IMSS-1 ΔSTY0041+pACY/ <i>ompR</i> +pWSK/STY0041	IMSS-1 ΔSTY0041 con los plásmidos pACY/ <i>ompR</i> y pWSK/STY0041. Cm ^R , Ap ^R	Este trabajo.
IMSS-1 ΔSTY0035+pACY/ <i>ompR</i> +pKK/STY0035	IMSS-1 ΔSTY0035 con los plásmidos pACY/ <i>ompR</i> +pKK/STY0035 Cm ^R , Ap ^R	Este trabajo.
IMSS-1 ΔSTY0038+pACY/ <i>ompR</i> +pKK/STY0038	IMSS-1 ΔSTY0038 con los plásmidos pACY/ <i>ompR</i> +pKK/STY0038 Cm ^R , Ap ^R	Este trabajo.
IMSS-1 ΔSTY0039+pACY/ <i>ompR</i> +pKK/STY0039	IMSS-1 ΔSTY0039 con los plásmidos pACY/ <i>ompR</i> +pKK/STY0039 Cm ^R , Ap ^R	Este trabajo.
IMSS-1 ΔSTY0040+pACY/ <i>ompR</i> +pKK/STY0040-STY0041	IMSS-1 ΔSTY0040 con los plásmidos pACY/ <i>ompR</i> +pKK/STY0040-STY0041 Cm ^R , Ap ^R	Este trabajo.
IMSS-1 ΔSTY0041+pACY/ <i>ompR</i> +pKK/STY0041	IMSS-1 ΔSTY0041 con los plásmidos pACY/ <i>ompR</i> +pKK/STY0041 Cm ^R , Ap ^R	Este trabajo.
IMSS-1 Δ <i>hns</i>	STY <i>hns99::Km^R mariner</i>	Flores-Valdez <i>et al.</i> , 2003

5.3. Plásmido utilizado en este estudio

Tabla 2. Plásmidos utilizados y sus características.

Plásmido	Descripción	Referencia
pKK232-8	Derivado del plásmido pBR322, contiene el gen reportero Cloranfenicol Acetiltransferasa (CAT) sin su promotor, Ap ^R .	Pharmacia LKB Botechnology
pKK232-8/STY0034	pKK232-8 conteniendo 584 pb rio arriba y 224 pb rio abajo del ATG del gen STY0034. Ap ^R .	Este trabajo.
pKK232-8/STY0035	pKK232-8 conteniendo 459 pb rio arriba y 103 pb rio abajo del ATG del gen STY0035. Ap ^R .	Este trabajo.
pKK232-8/STY0036	pKK232-8 conteniendo 471 pb rio arriba y 90 pb rio abajo del ATG del gen STY0034. Ap ^R .	Villarreal <i>et al.</i> , 2014.
pKK232-8/STY0038	pKK232-8 conteniendo 509 pb rio arriba y 147 pb rio abajo del ATG del gen STY0034. Ap ^R .	Este trabajo.
pKK232-8/STY0039	pKK232-8 conteniendo 516 pb rio arriba y 80 pb rio abajo del ATG del gen STY0039. Ap ^R .	Este trabajo.
pKK232-8/STY0040	pKK232-8 conteniendo 537 pb rio arriba y 1044 pb rio abajo del ATG del gen STY0041. Ap ^R .	Este trabajo.
pKK232-8/STY0041	pKK232-8 conteniendo 537 pb rio arriba y 167 pb rio abajo del ATG del gen STY0041. Ap ^R .	Este trabajo.
pKK232-8/STY0034	pKK232-8 conteniendo 645 pb rio arriba y 450 pb rio abajo del ATG del gen STY0034. Ap ^R .	Este trabajo.

pKK232-8/STY0035	pKK232-8 conteniendo 517 pb rio arriba y 584 pb rio abajo del ATG del gen STY0035. Ap ^R .	Este trabajo.
pKK232-8/STY0038	pKK232-8 conteniendo 591 pb rio arriba y 513 pb rio abajo del ATG del gen STY0038. Ap ^R .	Este trabajo.
pKK232-8/STY0039	pKK232-8 conteniendo 564 pb rio arriba y 1863 pb rio abajo del ATG del gen STY0039. Ap ^R .	Este trabajo.
pKK232-8/STY0040	pKK232-8 conteniendo 699 pb rio arriba y 2620 pb rio abajo del ATG del gen STY0041. Ap ^R .	Este trabajo.
pKK232-8/STY0041	pKK232-8 conteniendo 699 pb rio arriba y 921 pb rio abajo del ATG del gen STY0041. Ap ^R .	Este trabajo.
pKK232-8/STY0036	pKK232-8 conteniendo 471 pb rio arriba y 90 pb rio abajo del ATG del gen STY0036. Ap ^R .	Villarreal <i>et al.</i> , 2014.
pKK232-8/P1ompR-134-1	pKK232-8 conteniendo el promotor 1 de <i>ompR</i> . Ap ^R .	Villarreal <i>et al.</i> , 2014.
pKK232-8/P2ompR-383-133	pKK232-8 conteniendo el promotor 2 de <i>ompR</i> . Ap ^R .	Villarreal <i>et al.</i> , 2014.
pACY/ <i>ompR</i>	pACY1871 contiene la región promotora y codificante de <i>ompR</i> . Ap ^R , Cm ^R	Villarreal <i>et al.</i> , 2014.
pWSK29	Derivado del pLG339 conteniendo un origen pSC101. Ap ^R	Wang y Kushner, 1991
pWSK29-STY0036	pWSK29 conteniendo 369 pb rio arriba y 145 pb rio abajo del ATG de STY0036. Ap ^R	Villarreal <i>et al.</i> , 2014.
pWSK/STY0034	pWSK29 conteniendo 645 pb rio arriba y 450 pb rio abajo del ATG del gen STY0034. Ap ^R .	Este trabajo.
pWSK/STY0035	pWSK29 conteniendo 517 pb rio arriba y 584 pb rio abajo del ATG del gen STY0035. Ap ^R .	Este trabajo.
pWSK/STY0038	pWSK29 conteniendo 591 pb rio arriba y 513 pb rio abajo del ATG del gen STY0038. Ap ^R .	Este trabajo.
pWSK/STY0039	pWSK29 conteniendo 564 pb rio arriba y 1863 pb rio abajo del ATG del gen STY0039. Ap ^R .	Este trabajo.
pWSK/STY0040	pWSK29 conteniendo 699 pb rio arriba y 2620 pb rio abajo del ATG del gen STY0041. Ap ^R .	Este trabajo.
pWSK/STY0041	pWSK29 conteniendo 699 pb rio arriba y 921 pb rio abajo del ATG del gen STY0041. Ap ^R .	Este trabajo.
pKD4	Derivado de pANTSy. Contiene el gen de resistencia a Km, flanqueado por FRT's.	Datsenko y Warnner, 2000
pKD46	Derivado de pINT-ts, contiene el sistema de recombinación del fago λ rojo, bajo el promotor inducible por arabinosa. Ap ^R	Datsenko y Warnner, 2000
pCP20	Plásmido termosensible, expresa la recombinasa FLP; Ap ^R . Cm ^R	Cherepanov y Wackerangel, 1995

5.4. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Los oligonucleótidos aplicados en la amplificación de las regiones intergénicas 5' de los genes STY0034, STY0035, STY0038, STY0039, STY0040 y STY0041 se diseñaron empleando el programa OLIGO 6, después fueron sintetizados por la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Tabla 3. Oligos utilizados y su secuencia.

Secuencia	Dirección 5'→ 3'
STY0034-BamHIF	CGG GAT CCC AGT AGC AGC AGT CCT TTC CG
STY0034-KpnIR	GGG GTA CCT CGT TTT ACC GTT GCA TGA GG
STY0035-BamF	CGG GAT CCA GCC CTG GTT GCA TTT CCT TCA G
STY0035-KpnR	GGG GTA CCA ACG CGC ACG CAT TAG CGT CAC C
STY0038-509BaHF	CGG GAT CCT TAA TTC AGA TAT AGA CAA CGA GCG
STY0038+147KpR	GGG GTA CCA ATC TCT TGT TGT GCA TGA TTC AGC
STY0039-516BaHF	CGG GAT CCA TTT AAT GGG TTT AAT TGG GGT AGC
STY0039+80KpR	GGG GTA CCG CGT TAT TGG TAT CGA TTT TCT GG
STY0040-BamHIF	CGG GAT CCG GCT GCG GAA TAC AGC C
STY0040-KpnIR	GGG GTA CCG CTT TCC ACA CTT CGC CGC G
STY0041-KpnIR	GGG GTA CCG CAA AGC CGC CTA CCG GAC G
STY0035-517BamF	CGG GAT CCT TTG TAA ACG AAG AAG AGC C
STY0035+584KpnR	GGG GTA CCA GCA ATT AAC AGT GCT ACG C
STY0038-591BamFC	CGG GAT CCA TCG ATT TTC TGG TTA ATC G
STY0038+513KpnRC	GGG GTA CCT TTA GCC AGG AAA AAC AGC C
STY0039-564BamF	CGG GAT CCA TCA TTG TAA GTG TGC GTG C
STY0039+1863KpR	GGG GTA CCA TAG GGA TAC AAA CCG CAC C
STY0041-699BaF	CGG GAT CCT AAT GAC TAA GTT AGG ACG G
STY0040+2620KpR	GGG GTA CCC AAG AAA TCA ATA AAG AGA CG
STY0041+921KpnR	GGG GTA CCA AGA CAA ACC AAT GCA CAG C
STY0039+2183KpR	GGG GTA CCT GCC TAA AGG TAA TAT CAC CTA TGG
STY0041-967BamF	CGG GAT CCT AGC CCT GCT GTT TTA GCA GAT TGG
STY0040+2862KpR	GGG GTA CCT AAA ATA AAC CTA AAC ACG ATG ACC
STY0034-H1P1	CAC AGG AGT GAA AGT AAA ATG AAG TCT ATG CGT TGC GTC ATA
STY0034-H2P2	TGC GGT CTG CTA CGC GGT TCA GTC ATA GAC AAT GCG TAG CAA
STY0035-H1P1	TCA AAA CGG AGT GAA TTC ATG AGA CAA TAT ACT ATT AAT AAC
STY0035-H2P2	GGT CTA CAG ACT TTA TCT TCA GAT AAA CGG CGC TAA AAA GAA
STY0038-H1P1	AAC CCA TTA AAT AAC ATC ATG ACT ATT TAT TTA ATT AAC AGC
STY0038-H2P2	TGA TAA TAA TGT TGG CAT CTA CTT TAA TAC CCG TTC GAG GCA
STY0039-H1P1	ATT AAT AAG GAA AAA CGT ATG AAT AAG AAA AAT TCG TCA ATG
STY0039-H2P2	GCC GCA TAA CAT ACT TAG TTA TGC AAA CAG CGG CAT TTT GTA
STY0040-H1P1	TTA ATG TAG CGT AAA TGG ATG GTT TAT ATG AAC AAA AAG TTT
STY0040-H2P2	ACC GCA TAA CAT TAT GGC TTA TTT GCT AAT ATC ATC CAC GCG
STY0041-H1P1	TAC CTC ATG GAG TTG AGC ATG AAA AAT AAG AAA TAT ATT AAT
STY0041-H2P2	CAT CAA GTT TAT TAA TTA TTA AAA CTT GAA GCC GAT CAG GAT

5.5. Medios de cultivo

S. Typhi y *E. coli* fueron crecidas en condiciones aerobias a 37°C con o sin agitación (200 rpm) en medio LB (NaCl 10g/l, triptona 10g/l y extracto de levadura 5g/l) suplementado con la sal biliar deoxicolato de sodio (Sigma Chemical, St. Louis, MO) cuando fue requerido. Medio Mínimo N (MM-N) (KCl 0.3725 g/l, (NH₄)₂SO₄ 0.99 g/l, K₂SO₄ 0.08 g/l, KH₂PO₄ 0.136 g/l, Tris HCl pH 7.5 100 mM o 200 mM 50 ml, MgCl₂ 1M 200 µl, glicerol 5 ml y casaminoácidos 1 g/l) (Deiwick *et al.*, 1999).

Cuando fue necesario, se añadieron los siguientes antibióticos al medio de cultivo: kanamicina (Km) 30 µg/ml, ampicilina (Ap) 200 µg/ml y cloranfenicol (Cm) 34 µg/ml. X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolin-β-D-galactopiranosido) para la selección de las células recombinantes. Para preparar medio solido se añadió 15g/l de agar.

5.6. Manipulación de ADN

El ADN genómico de *S. Typhi* se aisló por medio de un kit comercial (Promega Madison). El diseño de oligonucleótidos se realizó con el programa OLIGO 6 y fueron generados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología-UNAM. Los productos de PCR se obtuvieron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific), las enzimas de restricción, ligasas, polimerasas y nucleótidos son de New England Biolabs y Gibco BRL. Los plásmidos y productos de PCR fueron purificados con High Pure Plasmid Isolation Kit y High Pure PCR Purification Kit (Roche Applied Science, Germany) respectivamente.

5.7. Construcción de cepas mutantes

Para la obtención de las mutantes de los genes STY0034, STY0035, STY0038, STY0039, STY0040 Y STY0041 se utilizó la técnica descrita por Datsenko y Warner, 2000. Esta metodología consiste en reemplazar una secuencia cromosómica, por un gen de

resistencia a un antibiótico, en este caso utilizamos el casete de kanamicina. Se genera un producto de PCR utilizando oligonucleótidos con extensiones homólogas correspondientes al gen a eliminar. Estas extensiones permitirán la recombinación mediante la recombinasa Red en las regiones flanqueadas al gen. Después de la selección de mutantes, la resistencia al antibiótico puede ser eliminada utilizando el plásmido pCP20 que expresa la recombinasa FLP, actuando sobre las secuencias repetidas FRT adyacentes al gen del antibiótico. Las cepas mutantes se verificaron por PCR's y por secuenciación.

5.8. Curvas de crecimiento en medio LB suplementado con 5% de deoxicolato de sodio

Para determinar la velocidad de crecimiento, *S. Typhi* IMSS-1 y las mutantes del clúster STY0034-STY0041 fueron crecidas en LB con deoxicolato de sodio al 5%, primero se creció cada una de estas cepas en placas de agar LB, que se incubaron durante 24 h a 37°C.

Después se inoculó una colonia en tubos de ensayo con 5 ml de LB líquido, incubándose a 37°C durante 12 h. De estos preinóculos se tomó en condiciones estériles 1 ml del cultivo para calcular la DO₅₉₅ de cada cepa y así inocular cada matraz de LB suplementado con deoxicolato de sodio con el mismo número aproximado de células. Una vez inoculados los matraces se midió la DO₅₉₅ inicial de cada cultivo y posteriormente se fue midiendo cada hora por un periodo de 12h. Se realizó por duplicado.

5.9. Complementaciones

Para realizar la complementación de cada mutante Δ STY0034, Δ STY0035, Δ STY0038, Δ STY0039, Δ STY0040 Y Δ STY0041, se clonaron en los plásmidos pWSK29 y pKK232-8 las regiones promotoras y codificantes de cada gen. Todas las construcciones fueron introducidas en las mutantes correspondientes por electroporación. Además, a cada una de las cepas complementadas se añadió el plásmido pACY/*ompR* el cual contiene el promotor y el gen nativo de *ompR*. Los plásmidos recombinantes fueron purificados por kit High Pure Plasmid Isolation (Roche Applied Science) y verificados por secuenciación.

5.10. Purificación y electroforesis de proteínas de membrana externa

Las proteínas de membrana externa se aislaron de las cepas *S. Typhi* IMSS-1 y de cada una de las mutantes del cluster Δ STY0034, Δ STY0035, Δ STY0038, Δ STY0039, Δ STY0040 Y Δ STY0041, así como de cada una de las cepas complementadas con sus respectivos plásmidos crecidas en MNN como se describe a continuación: Las cepas a evaluar se crecieron en placas de LB con el antibiótico correspondiente durante 24 h a 37°C. Después se inoculo una colonia aislada en 7 ml de LB líquido, se incubó en agitación a una temperatura de 37°C durante 16 h, se tomaron 3 ml del preinoculo y fueron centrifugados, se lavó la pastilla celular con MM-N, nuevamente se centrifugo y el pellet fue resuspendido en 500 μ l de MM-N, se inocularon matraces de 250 ml que contenía 50 ml de MM-N hasta alcanzar una DO_{595} de 0.6, se recolectaron 15 ml del cultivo y se centrifugó a 7000 rpm durante 8 min a una temperatura de 4°C, las pastillas se resuspendieron en 1 ml de buffer fosfato (Na_2HPO_4 , pH 7.2 10 mM), se centrifugaron 2 min a 12000 rpm a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y la pastilla conteniendo las proteínas de interés, se resuspendió en 500 μ l de buffer fosfato, se resuspenden las células por medio de un vortex. Posteriormente se lisaron las células usando un sonicador Vibra Cell (Sonics and Materials, Inc), utilizando el siguiente programa durante 3 min (9.9 s ON – 9.9 s OFF) se repite dos veces para cada muestra, después se centrifuga a 12000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente, se recolecta el sobrenadante en tubos eppendorf nuevos y se centrifugo 1h a 12000 rpm a 4°C. Las proteínas de membrana externa (PME) se solubilizaron resuspendiéndose en 500 μ l de buffer fosfato suplementado con 2% de Tritón X-100 durante 30 min a 37°C. Finalmente se centrifugo 1h a 12000 rpm a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con buffer fosfato, una vez más se centrifugo 1h a 12000 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante para solo tener las PME, por último se añadió 50 μ l de PBS 1X pH 7.4. Las PME se cuantificaron con el kit BCA Protein Assay Kit Reagent, se tomaron 15 μ g de cada muestra para ser analizadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida (12% SDS-PAGE) y se separaron a un voltaje de 10 mA durante 17 h. Las PME se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie.

5.11. Electroforesis en gel de 2 dimensiones de proteínas de membrana externa

Las cepas *S. Typhi* IMSS-1, *ltrRΔP2* y *ltrRΔP1* se crecieron en placas de LB durante 24 h a 37°C. Después se inoculó una colonia aislada en un matraz que contenía 12 ml de LB líquido, se incubó en agitación a una temperatura de 37°C durante 16 h, se tomaron 10 ml del preinoculo y fueron centrifugados, se lavó la pastilla celular con MM-N, nuevamente se centrifugo y el pellet fue resuspendido en 500 μl de MM-N, se inocularon matraces Fernbach que contenía 500 ml de MM-N. Posteriormente se recolectaron los 500 ml del cultivo a una DO_{595} de 0.6 y se centrifugó a 7000 rpm durante 8 min a una temperatura de 4°C. Las pastillas fueron lavadas con 35 ml de buffer fosfato (Na_2HPO_4 , pH 7.2 10 mM), se centrifugo 2 min a 12000 rpm a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y la pastilla conteniendo las proteínas de interés, se resuspendió en 3 ml de buffer fosfato, las células se resuspendieron con un vortex y se lisaron utilizando la prensa de French; esta técnica consiste en romper las células por medio de presión, se aplicó una presión de 900 psi, esto se realizara 5 veces a cada una de las muestras. Después se centrifuga a 12000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente, se recolecta el sobrenadante en tubos eppendorf nuevos y se centrifugó 1h a 12000 rpm a 4°C. Las proteínas de membrana externa (PME) se solubilizaron resuspendiéndose en 2.5 ml de buffer fosfato suplementado con 2% de Tritón X-100 durante 30 min a 37°C. Finalmente se centrifugó 1h a 12000 rpm a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 2.5 ml de buffer fosfato, una vez más se centrifugó 1h a 12000 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante para solo tener las PME. La cuantificación de proteínas se realizó utilizando la técnica de Bradford.

El análisis de electroforesis en 2-DGE y el análisis de imágenes, se realizaron como se ha reportado previamente (Encarnacion *et al.*, 2003). La separación de proteínas en un gradiente de pH se realizó mediante electroforesis bidimensional en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (Sigma, USA). Para identificar el punto

isoeléctrico se cargaron 50 µg de proteínas de membrana externa. Las PME se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie.

5.12. Construcciones de fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*

Se amplificó por PCR las regiones intergénicas de los genes STY0034, STY0035, STY0038, STY0039, STY0040 Y STY0041 utilizando la enzima *Pfu Turbo*® DNA Polymerase (Stratagene). Los fragmentos de ADN obtenidos se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Kpn*I, posteriormente se ligaron al plásmido pKK232-8 y se transformaron por choque térmico en células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes, las recombinantes fueron seleccionadas mediante la resistencia a ampicilina. Los plásmidos seleccionados se purificaron con el kit High Pure Plasmid Isolation (Roche Applied Science) siguiendo el protocolo correspondiente y cada uno fue secuenciado en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología-UNAM para corroborar que la secuencia nucleotídica fuera la correcta. Posteriormente los plásmidos recombinantes con cada una de las fusiones transcripcionales de los genes del cluster STY0034-STY0041 se transformaron utilizando electroporación en las cepas *S. Typhi* IMSS-1 y finalmente se realizaron las cinéticas de expresión utilizando el gen reportero *cat*.

5.13. Ensayos de Actividad CAT

Las cepas por evaluar fueron crecidas en medio LB solido durante 24 h a 37°C sin agitación, se añadió el antibiótico correspondiente. Posteriormente se seleccionó una colonia aislada y se inoculo en un tubo de ensaye con 7 ml de LB liquido durante 16 h a 37°C con agitación (200 rpm), 3 ml de este cultivo fueron centrifugados, se lavaron con MM-N y se inocularon en 50 ml de MM-N Tris 100 mM, los cultivos se incubaron a 37°C (200 rpm) en condiciones aerobias, se colectaron muestras en diferentes puntos del crecimiento bacteriano, DO₅₉₅ de 0.4, 0.6, 0.8, (1.5 ml) 1.0 (1 ml) y 1.2 (600 µl), estas bacterias son centrifugadas a 13000 rpm por 2 min, posteriormente se retira el sobrenadante, se lavan con 0.8 ml de TDDT (Tris-HCl pH 7.8 50 mM-DTT 30 µM) finalmente se reuspendió en 0.6 ml de este antioxidante. Las muestras se sonicán durante 3

min (9.9 s ON – 9.9 s OFF) en un sonicador Vibra Cell (Sonics and Materials, Inc), posteriormente se centrifugan durante 15 min a 13000 rpm y el sobrenadante se transfiere a tubos Eppendorf.

La cuantificación de proteínas totales se determina por el método espectrofotométrico utilizando el BCA Protein Assay Kit Reagent (Pierce). Las proteínas de la muestra reducen el Cu^{2+} a Cu^+ , el cual interacciona con el BCA (Ácido Bicinconínico) produciendo una coloración cuantificable a 562 nm. En una placa de 96 pozos (Costar) se añadió 10 μl de cada extracto por duplicado, se añadió una mezcla de la reacción BCA, se incubó la reacción durante 30 min a 37°C y se determinó la concentración de proteínas en un lector Ceres 900-C (Bio-Tek Instruments, Inc.).

La actividad enzimática CAT se determinó espectrofotométricamente utilizando una mezcla de Acetil Coenzima A (Acetil-CoA) 0.1mM, cloranfenicol 0.1mM y DNTB [ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico)] 1mM en Tris-HCl pH 7.8 0.1 M. La enzima cloranfenicol acetil transferasa transfiere el grupo acetilo del acetil-CoA al cloranfenicol inactivándolo y la CoA reducida reacciona con el DNTB produciendo CoA-disulfuro, ácido trinitrobenzoico y tionitrobenzoico libre, compuesto que absorbe a 412 nm. En una placa de 96 pozos se colocó por duplicado 5 μl de cada extracto, agregando 200 μl de la reacción anterior y se determinó la actividad CAT en un lector tipo Ceres a intervalos de 5s durante 5 min. La actividad específica CAT (mol/min/mg) se obtuvo al dividir las unidades CAT entre la concentración de proteínas totales de cada muestra.

6. RESULTADOS

6.2. STY0036 (*ltrR*) participan en la resistencia a deoxicolato de sodio

En nuestro grupo de trabajo se ha descrito un regulador tipo LysR denominado LtrR, el cual está involucrado indirectamente en la resistencia a deoxicolato de sodio ya que este factor transcripcional regula positivamente y de forma directa a *ompR*, posteriormente la proteína OmpR induce la síntesis de las proteínas de membrana externa OmpC y OmpF y siendo la porina OmpC el componente genético que se encuentra directamente involucrada en la resistencia a deoxicolato de sodio (Villarreal *et al.*, 2014).

ltrR consta de dos proteínas LtrR2 y LtrR1 codificadas a partir de promotores *ltrRP2* y *ltrRP1*. Mutaciones en la caja -10 de cada promotor fueron obtenidas. El perfil de proteínas de membrana externa de la cepa *ltrRΔP2* carece de la porina OmpC y en la mutante *ltrRΔP1* se observa la ausencia de OmpF (Fig. 4A). *ltrRΔP1* en el perfil de porinas muestra la presencia de OmpC y como previamente se mencionó la proteína OmpC es la porina requerida para la resistencia a sales biliares, por esta razón decidimos evaluar la tasa de crecimiento de esta mutante en deoxicolato de sodio (Fig. 4B).

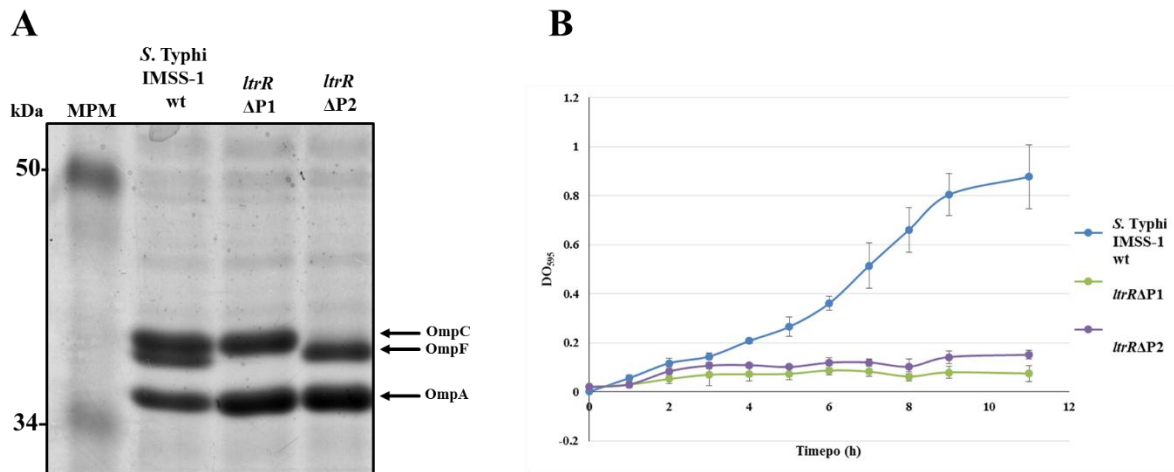


Fig. 4 A) Perfil de proteínas de membrana externa de las cepas *S. Typhi* IMSS-1 wt, *ltrRΔP1* y *ltrRΔP2* en MM-N. B) Curva de crecimiento en LB + 5% de deoxicolato de sodio de las cepas *S. Typhi* IMSS-1 wt, *ltrRΔP1* y *ltrRΔP2*. Con flechas se indican las proteínas de membrana en kDa.

En la figura 4B se muestra la curva de crecimiento de las cepas IMSS-1 wt, *ltrRΔP1* y *ltrRΔP2*. La cepa *ltrRΔP1* a pesar de expresar OmpC no es capaz de crecer en presencia de deoxicolato de sodio, en el caso de la mutante *ltrRΔP2* el fenotipo de sensibilidad a deoxicolato de sodio es explicable debido a la pérdida de OmpC.

6.3. LtrR1 y LtrR2 son requeridos para sintetizar los niveles necesarios de la porina OmpC en MM-N

Debido a que la cepa *ltrRΔP1* presenta la porina OmpC y es sensible a deoxicolato de sodio, nosotros realizamos geles de dos dimensiones de proteínas de membrana externa de la cepa silvestre IMSS-1, así como de las mutantes *ltrRΔP2* y *ltrRΔP1* en MM-N (Deiwick *et al.*, 1999) (Fig. 5). Los resultados muestran que en la cepa silvestre hay 6 isoformas para OmpF y 4 isoformas para OmpC, en la cepa *ltrRΔP2* se abate la expresión de las 4 isoformas de OmpC mientras que en la cepa *ltrRΔP1* disminuye la expresión de OmpC. Estos resultados nos indican que la cepa mutante en Δ *ltrRP2* es sensible a deoxicolato de sodio por la pérdida de las 4 isoformas de OmpC y la cepa *ltrRΔP1* es sensible a esta sal biliar debido a que las isoformas 6, 8 y 9 de OmpC disminuyen su expresión, por lo tanto, existen menos cantidad de esta porina en la membrana externa, provocando la sensibilidad a deoxicolato de sodio (Tabla 4). La mutante *ltrRΔP1* pierde las 6 isoformas de OmpF, esto nos sugiere que LtrR1 es indispensable para sintetizar cada una de las isoformas de la proteína de membrana externa OmpF.

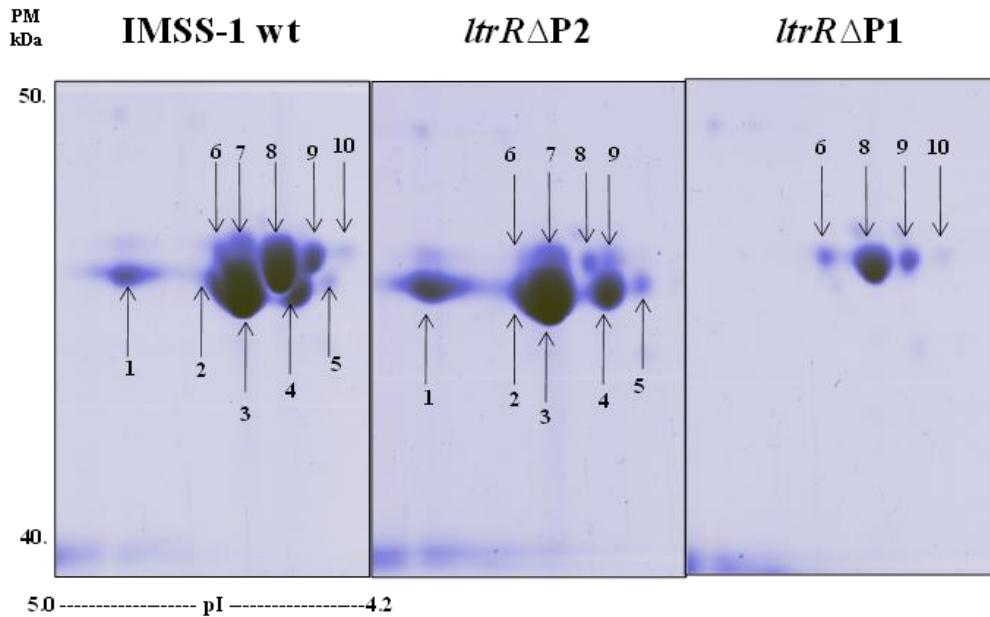


Fig. 5 Gel de 2 Dimensiones de las cepas IMSS-1 wt, *ltrRΔP2* y *ltrRΔP1* en MM-N. Con una flecha y número (1-10) se marcan los spots que corresponde a OmpC (6, 8, 9 y 10) y OmpF (1, 2, 3, 4, 5 y 7).

Tabla 4. Proteínas de membrana externas expresadas en MM-N. Se indica el número de spot y la densidad óptica de cada porina en las cepas IMSS-1 wt, *ltrRΔP1* y *ltrRΔP2*.

Spot	Proteína	DO		
		IMSS-1 wt	<i>ltrRΔP2</i>	<i>ltrRΔP1</i>
1	OmpF	204.2	686.8	ND
2	OmpF	347.5	349.4	ND
3	OmpF	2878.8	2861.8	ND
4	OmpF	600.08	612.3	ND
5	OmpF	31.6	71.9	ND
6	OmpC	57.1	19.9	69.3
7	OmpF	116.8	114.5	ND
8	OmpC	1809.4	76.6	816.1
9	OmpC	299.2	58.7	88.3
10	OmpC	3.4	ND	1.2

Lo anterior demuestra que los dos promotores de *ltrR* son fundamentales para la adecuada síntesis de OmpC en *S. Typhi*.

ltrR se encuentra localizado en la parte central de un grupo de proteínas hipotéticas STY0034, STY0035, *ltrR*, STY0038, STY0039, STY0040 y STY0041, los cuales poseen un porcentaje de G-C del 35 al 45%, este valor de G-C difiere considerablemente de la cantidad de G-C del genoma de *S. Typhi* (G-C 50%), por lo tanto es posible que este conjunto de genes podrían estar involucradas en la resistencia a sales biliares en *S. Typhi* como *ltrR*.

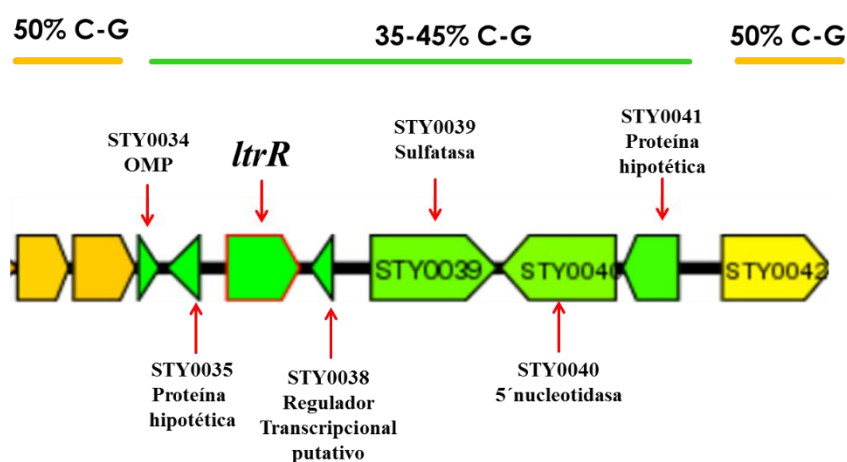


Fig. 6 Representación esquemática del clúster STY0034-STY0041. La figura incluye el porcentaje de Citocina-Guanina.

6.4. El clúster STY0034-STY0041 está involucrado en la resistencia a sales biliares

De manera interesante el regulador *LtrR* está localizado en el clúster STY0034-STY0041 (Fig.6) estos genes comparten un porcentaje similar de GC (35-45%) entre ellos, sugiriendo que este locus se obtuvo por transferencia horizontal y que este grupo de genes podrían participar en un mismo proceso biológico. Considerando que *LtrR* tiene un papel en la resistencia a deoxicolato de sodio, decidimos evaluar si el resto de los componentes del clúster STY0034-STY0041 participa en el mecanismo de resistencia a sales biliares. Para responder si los genes STY0034, STY0035, STY0038, STY0039, STY0040 y STY0041 participan en la resistencia a la sal biliar deoxicolato de sodio, se generaron

deleciones de cada uno de estos genes utilizando la técnica de Datsenko y Warnner (2000), posteriormente se realizó una curva de crecimiento en LB suplementado con 5% de deoxicolato de sodio (Fig.7).

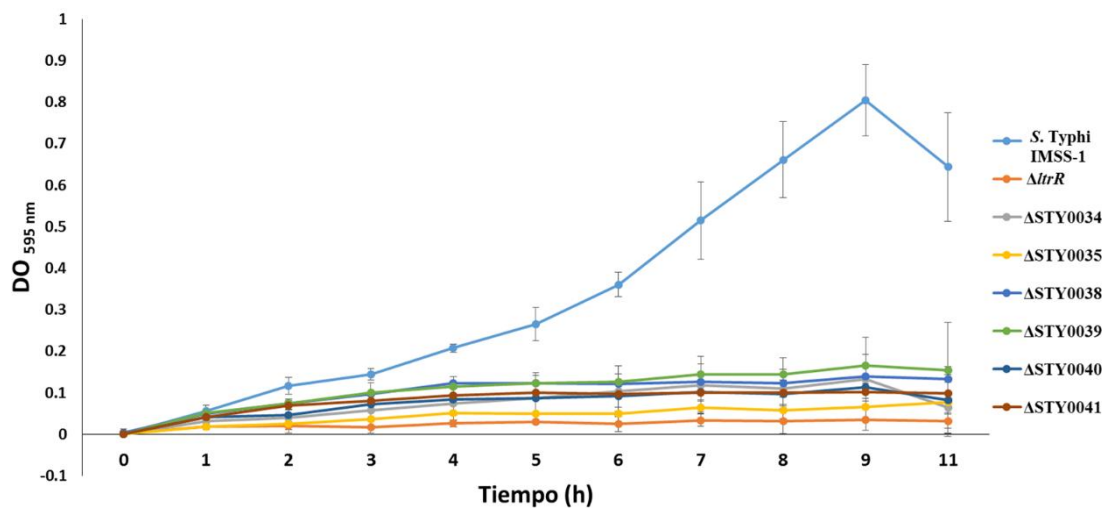


Fig. 7 Curva de crecimiento de las cepas *S. Typhi* IMSS-1, $\Delta ltrR$, $\Delta STY0034$, $\Delta STY0035$, $\Delta STY0038$, $\Delta STY0039$, $\Delta STY0040$ y $\Delta STY0041$ en medio LB suplementado con deoxicolato de sodio 5%.

La cepa *S. Typhi* IMSS-1 se utilizó como control positivo y la cepa mutante en $\Delta ltrR$ como control negativo. Como se observa en la figura 7, la tasa de crecimiento de las mutantes disminuyó con respecto a la cepa silvestre. Estos datos nos sugieren que este conjunto de genes está implicado en el mecanismo de resistencia a deoxicolato de sodio. Previamente demostramos que *ltrR*, componente del clúster STY0034-STY0041, controla positivamente a *ompR* y *OmpR* promueve la síntesis de *OmpC*. Nuestro estudio demuestra que tanto en $\Delta ltrR$, $\Delta ompR$ y $\Delta ompC$ se encuentra ausente *OmpC* (Villarreal *et al.*, 2014), por lo tanto, estas cepas son sensibles a deoxicolato de sodio. Debido a lo anterior realizamos el perfil de proteínas de membrana externa de cada una de las mutantes del clúster STY0034-STY0041 (Fig. 8).

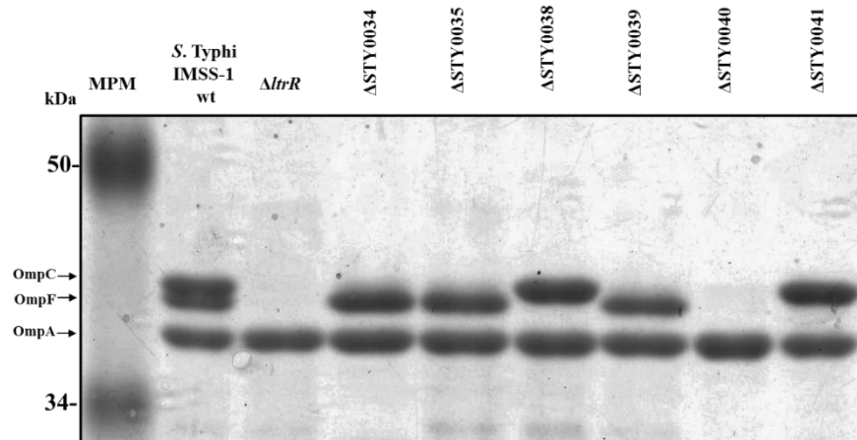


Fig. 8 Perfil de proteínas de membrana externa de las mutantes del clúster STY0034-STY0041 en MM-N a un DO_{595} de 0.6. Como control positivo se utilizó la cepa *S. Typhi* IMSS-1 y la cepa $\Delta ltrR$ como control negativo. Con las flechas se indican las porinas más abundantes OmpC, OmpF y OmpA. MPM: Marcador de peso molecular en kDa.

Como se puede observar en la figura 8, las mutantes Δ STY0034, Δ STY0035 y Δ STY0039 carecen de OmpC, lo cual explica porque estas cepas son sensibles a deoxicolato de sodio. Sin embargo, las cepas Δ STY0038 y Δ STY0041 sólo presentan a OmpC, es posible que en estas mutantes OmpC se encuentre disminuida, razón por la cual estas bacterias son sensibles a deoxicolato de sodio. Finalmente, en la cepa Δ STY0040 observamos la ausencia de ambas porinas OmpC y OmpF al igual que en la mutante $\Delta ltrR$.

6.5. Restablecimiento de la síntesis de proteínas de membrana externa de cada mutante del clúster STY0034-STY0041

Para corroborar que el clúster STY0034-STY0041 es importante para el crecimiento de *S. Typhi* en presencia de deoxicolato de sodio, se procedió a complementar cada mutante de manera individual con el vector pWSK29 (6-8 copias) (Wang and Kushner 1991), conteniendo la región reguladora y la zona codificante del gen correspondiente: pWSK/STY0035, pWSK/STY0038, pWSK/STY0039, pWSK/STY0040 y pWSK/STY0041, las mutantes se transformaron con su respectivo plásmido de complementación y se procedió a realizar un perfil de proteínas de membrana externa en MM-N a DO_{595} 0.6. Sin embargo, en ninguna de las mutantes individuales de los genes STY0034-STY0041 fue posible restablecer el fenotipo silvestre (Datos no mostrados).

Debido a el resultado anterior el cual indica que los genes del clúster STY0034-STY0041 regulan la síntesis de OmpC y OmpF posiblemente a través de OmpR, decidimos complementar cada una de las mutantes Δ STY0034, Δ STY0035, Δ STY0038, Δ STY0039, Δ STY0040 y Δ STY0041 utilizando el vector pACY/ompR el cual contiene el promotor y el gen nativo de *ompR*, de esta forma comprobaremos si al aumentar la cantidad de la proteína OmpR se puede restablecer el perfil de porinas y por lo tanto, la resistencia de cada una de estas cepas a deoxicolato de sodio (Fig. 9). Evaluamos el crecimiento de estas cepas complementadas en medio LB adicionado con deoxicolato de sodio, pero ninguna de ellas fue capaz de crecer a los niveles de la cepa silvestre (Fig. 11).

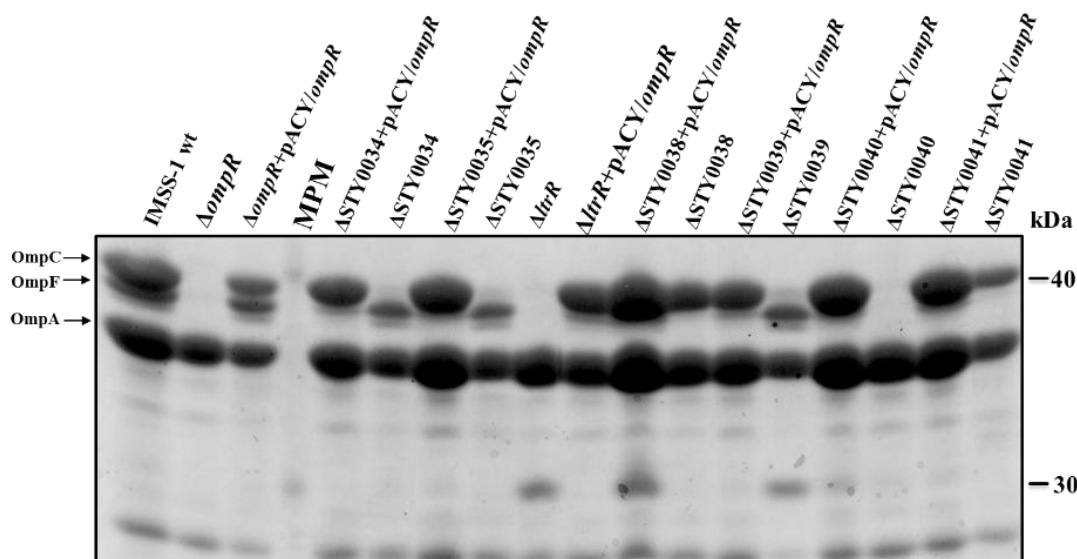


Fig. 9 Perfil de proteínas de membrana externa de las mutantes del clúster STY0034-STY0041 complementadas con el plásmido pACY/ompR en MM-N. Como controles se utilizaron las cepas IMSS-1 wt, Δ ompR y Δ ompR/pACY/ompR. Con flechas se indican las proteínas OmpC, OmpF y OmpA. MPM: marcador de peso molecular en kDa.

El gel de la figura 9 muestra que la presencia del plásmido pACY/ompR ocasiona un aumento en la síntesis de OmpC y la desaparición de la porina OmpF, como se muestra en las cepas Δ STY0034+pACY/ompR, Δ STY0035+pACY/ompR y Δ STY0039+pACY/ompR. En las cepas Δ ltrR+pACY/ompR y Δ STY0040+pACY/ompR solo se restableció la síntesis de OmpC.

Considerando el resultado anterior decidimos transformar en cada una de las mutantes Δ STY0035, Δ STY0038, Δ STY0039, Δ STY0040 y Δ STY0041 el vector pACY/*ompR* y el plásmido pWSK29 (bajo número de copias) albergando el gen correspondiente de cada mutación, también en nuestras mutantes realizamos otro juego de complementación: pACY/*ompR* y pKK232-8 (Hernández-Lucas *et al.* 2008) (mediano número de copia) conteniendo el gen correspondiente para complementar cada cepa mutante y se realizaron perfiles de porinas para determinar si la cantidad de las proteínas del clúster STY0034-STY0041 influye en el restablecimiento de la síntesis de OmpC y OmpF (Fig. 10).

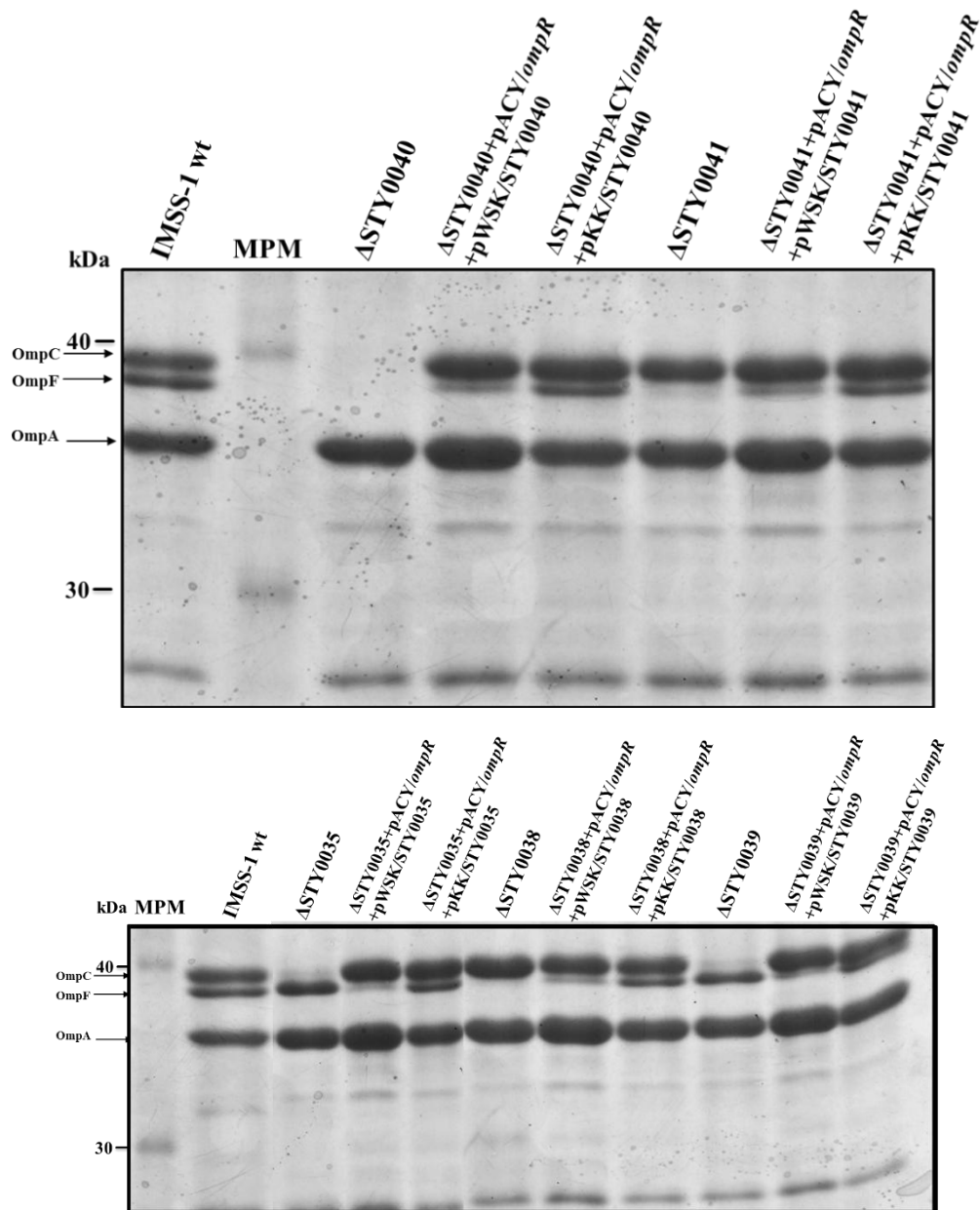


Fig. 10 Perfiles de proteínas de membrana externa de las mutantes del clúster STY0034-STY0041 complementadas con el plásmido *pACY/ompR* y el vector *pWSK29* o *pKK232-8* conteniendo el gen correspondiente para complementar las cepas mutantes. Con flechas se indican las proteínas de membrana externa OmpC, OmpF y OmpA. Cada una de las muestras fue colectada a una DO_{595nm} de 0.6 en MM-N. MPM: marcador de peso molecular en kDa.

En la figura 10 podemos observar que las cepas mutantes complementadas con *pACY/ompR* y *pWSK29* conteniendo el gene correspondiente de cada mutación, se restablece parcialmente el perfil de porinas de *S. Typhi* IMSS-1. Sin embargo, las cepas

mutantes complementadas con pACY/*ompR* y el respectivo gene silvestre clonado en el vector pKK232-8 mostro un perfil de proteínas de membrana externa muy similar al de la cepa silvestre. El perfil de porinas demuestra que efectivamente el número de copias del plásmido fue un factor determinante para restablecer el fenotipo de las porinas OmpC y OmpF.

6.6. Resistencia a deoxicolato de sodio de las mutantes del clúster STY0034-STY0041 complementadas

Finalmente evaluamos la resistencia a deoxicolato de sodio de cada una de las mutantes del clúster STY0034-STY0041 complementadas de forma individual con los plásmidos pACY/*ompR*, pACY/*ompR* + pWSK29 o pKK232-8 que contienen el gen correspondiente a cada mutación y se realizó una curva de crecimiento en medio LB suplementado con 5% de deoxicolato de sodio (Fig. 11).

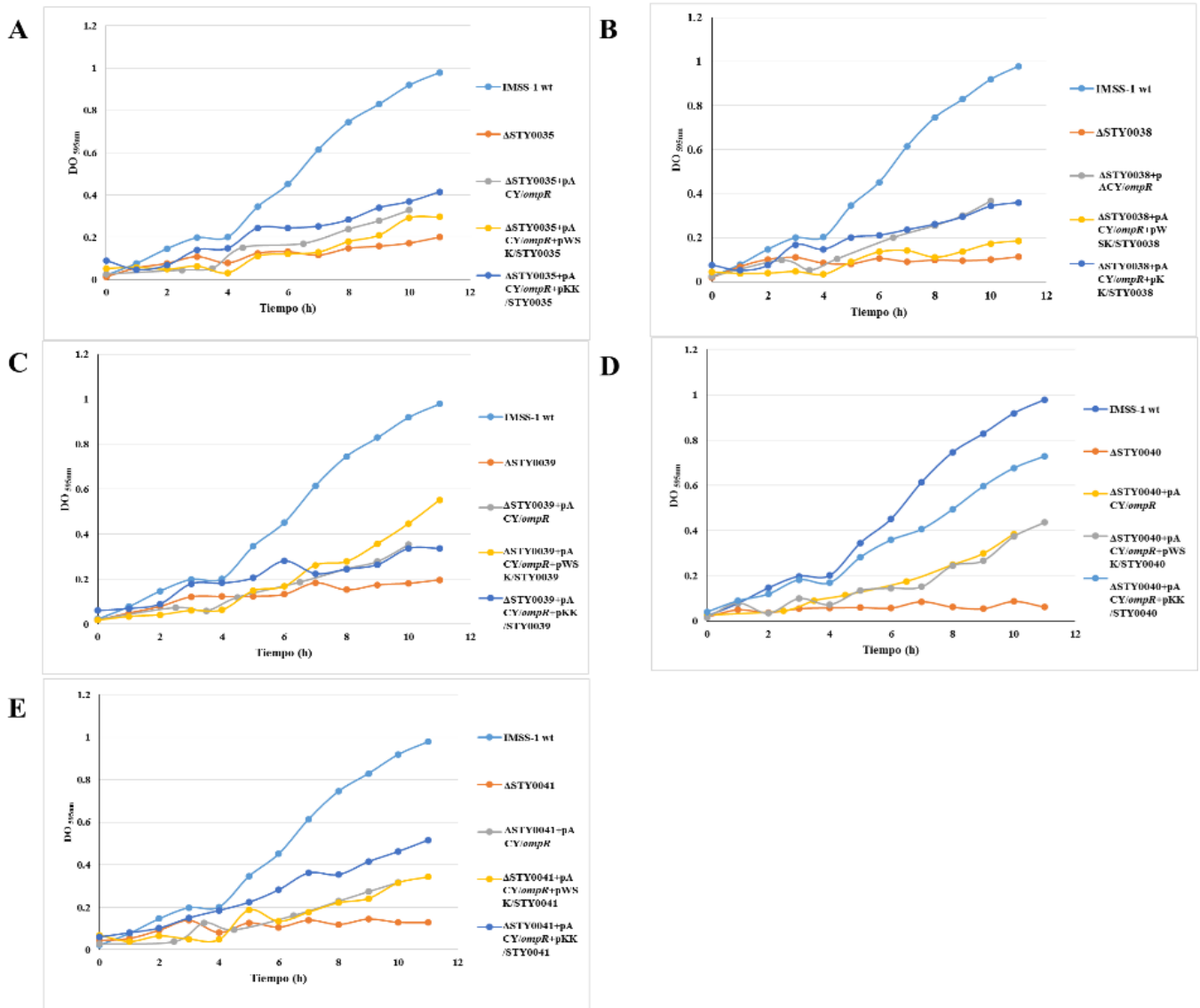


Fig. 11 Curva de crecimiento en medio LB suplementado con 5% de deoxicolato de sodio de las cepas: A) Δ STY0035, B) Δ STY0038, C) Δ STY0039, D) Δ STY0040 y E) Δ STY0041 complementadas con los plásmidos pACY/*ompR*, pACY/*ompR*+pWSK29 conteniendo el gen correspondiente a cada mutación o pACY/*ompR*+pKK232-8 albergando el gen correspondiente para complementar de manera individual cada mutante. Como control se utilizó la cepa *S. Typhi* IMSS-1.

Como se observa en la figura 11 las cepas mutantes complementadas con pACY/*ompR*+pWSK conteniendo el gen correspondiente a cada mutación son capaces de crecer hasta una DO₅₉₅ de 0.2. Las mutantes complementadas con el plásmido pACY/*ompR* y el vector de mediano número de copias (pKK232-8) que alberga de forma individual el gen correspondiente a cada mutación, estas cepas son capaces de alcanzar una DO₅₉₅ de 0.4 en presencia de deoxicolato de sodio. Sin embargo, la cepa ΔSTY0040 complementada con pACY/*ompR*+pKK/STY0040-STY0041, es decir contiene ambos genes y la mutante ΔSTY0041 que contiene el plásmido pACY/*ompR* y el vector pKK/STY0041 crecen en deoxicolato de sodio a una DO₅₉₅ de 0.8 y 0.5 respectivamente, lo cual implica un mejor crecimiento con respecto a la cepa mutante (Fig. 11 D).

Estos resultados nos indican que cada uno de los genes del clúster son importantes para tener la cantidad exacta de OmpR y posteriormente pueda activar la síntesis de OmpC y OmpF en los niveles requeridos.

6.7. Mutantes en cada uno de los genes del clúster STY0034-STY0041 afectan la expresión de *ompR*

Como sabemos OmpR regula de forma positiva la expresión de OmpC y OmpF. Con el objetivo de determinar si alguno de los genes del clúster STY0034-STY0041 controla la expresión de *ompR* decidimos evaluar en cada una de las mutantes de este clúster la fusión pKK232-8/*ompR*-134-1 que contiene al promotor 1 de *ompR* y la fusión pKK232-8/*ompR*-383-133 donde se ubica el promotor 2 de este gen (Fig. 12). La actividad específica CAT de la fusión pKK232-8/*ompR*-383-133 fue similar en cada una de las mutantes del clúster respecto a los niveles obtenidos en la cepa silvestre IMSS-1. La fusión pKK232-8/*ompR*-134-1 muestra una disminución en la actividad CAT en las cepas ΔSTY0034, ΔSTY0035, ΔSTY0038, ΔSTY0039, ΔSTY0040 y ΔSTY0041 similar a *S. Typhi* Δ*ltrR*, esto nos indica que cada gen afecta únicamente la actividad del promotor 1 de *ompR*.

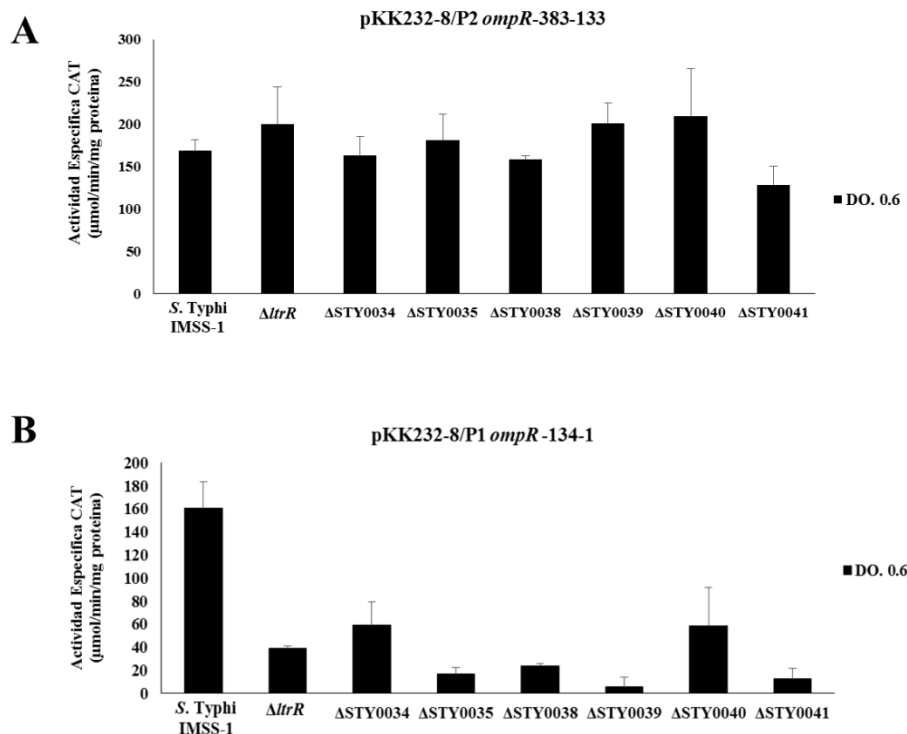


Fig. 12 Actividad transcripcional del promotor 2 (A) y promotor 1 (B) de *ompR* en las cepas *S. Typhi* IMSS-1, Δ *ltrR*, Δ STY0034, Δ STY0035, Δ STY0038, Δ STY0039, Δ STY0040 y Δ STY0041, cultivadas en MM-N a DO₅₉₅ 0.6.

6.8. HN-S regula negativamente la expresión de STY0035

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que en MM-N la proteína H-NS controla de forma negativa la expresión del regulador LysR LtrR, H-NS se une específicamente entre los nucleótidos -260 y -140 con respecto al ATG de *ltrR*. STY0035 se encuentra ubicado de forma divergente a *ltrR* y comparte la zona de unión de H-NS, por esta razón decidimos generar una fusión transcripcional de la región intergenica 5' de STY0035, así como de cada uno de los genes que integran el clúster STY0034-STY0041 y evaluar cada construcción en una cepa Δ *hns* en MM-N. Estas fusiones se realizaron tomando las zonas regulatorias (ZR) de la región 5' de cada uno de los genes a evaluar, tales ZR fueron obtenidas mediante amplificación por PCR tomando como templado DNA de la cepa silvestre de *S. Typhi* IMSS-1. Los PCRs fueron ligados al plásmido pKK232-8 o pKK232-9 y se obtuvieron seis fusiones transcripcionales: pKK8/STY0034, pKK8/STY0035, pKK9/STY0038, pKK9/STY0039, pKK9/STY0040 y pKK9/STY0041. Cada construcción fue transformada

en la cepa silvestre de *S. Typhi* IMSS-1 y en la mutante IMSS-1 Δhns , posteriormente las fusiones se evaluaron en MM-N a una DO_{595} 0.6.

Las fusiones correspondientes a los genes STY0038, STY0039, STY0040 y STY0041 no presentaron actividad transcripcional en ningún fondo genético (datos no mostrados). H-NS no controla negativamente al gen STY0034 ya que los niveles de expresión son similares en la IMSS-1 WT, así como en la Δhns . Sin embargo, H-NS reprime la expresión de STY0035, en una cepa mutante Δhns los niveles de actividad CAT de la fusión pKK8/STY0035 incrementan (Fig. 13).

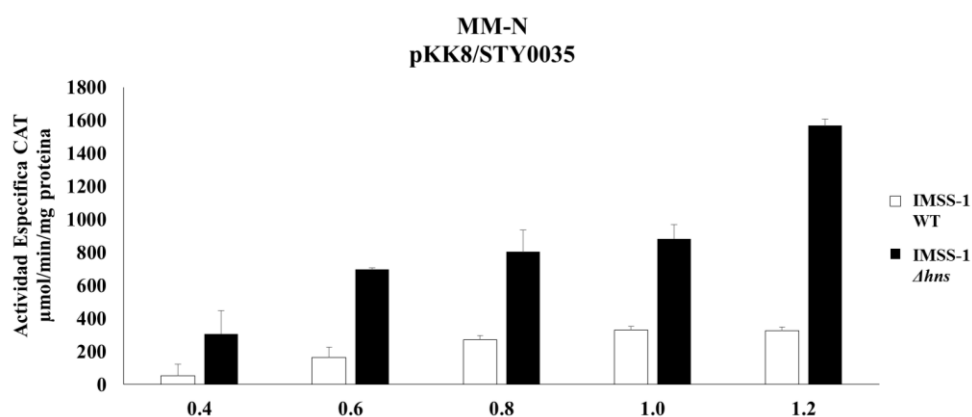


Fig. 13 Actividad específica CAT de la fusión pKK8/STY0035 en una cepa IMSS-1 WT (barras blancas) y en la cepa mutante Δhns (barras negras) en MM-N.

Las fusiones pKK9/STY0038, pKK9/STY0039, pKK9/STY0040 y pKK9/STY0041 no muestran actividad transcripcional en ninguno de los fondos genéticos evaluados, debido a este resultado decidimos evaluar cada fusión en medio LB suplementado con 5% de deoxicolato de sodio y en MM-N (Fig. 14). Las fusión pKK8/STY0034 mostro 2661 ± 139 unidades CAT en MM-N y 2955 ± 259 en LB+ 5% deoxicolato, los niveles de expresión de la fusión pKK8/STY0035 en MM-N son de 123 ± 25 , sin embargo en LB+ 5% deoxicolato los niveles de expresión fueron de 47 ± 5 unidades CAT, *ltrR* presenta actividad transcripcional en ambos medios, en MM-N los niveles de expresión son de 358 ± 1.02 y en medio LB+5% deoxicolato de sodio fue de 112 ± 13.1 Finalmente las fusiones pKK9/STY0038, pKK9/STY0039, pKK9/STY0040 y pKK9/STY0041 no presentaron actividad transcripcional en ninguno de los dos medios evaluados (Fig. 14).

DO₅₉₅ 0.6

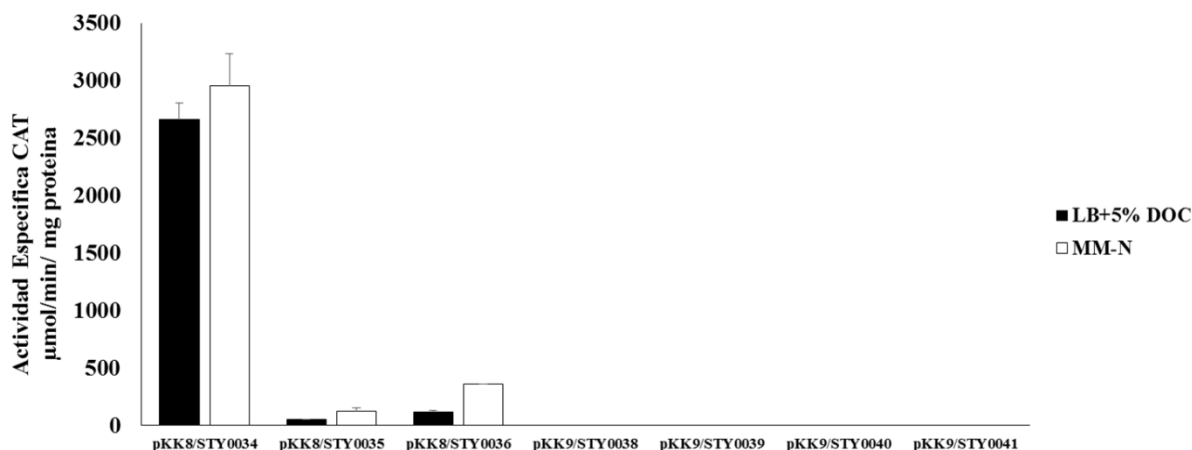


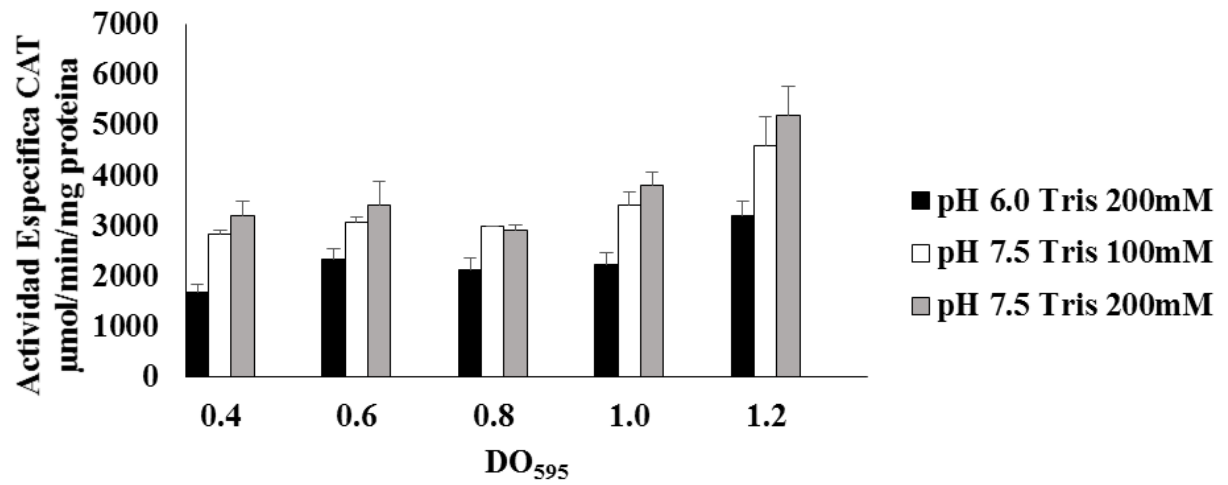
Fig. 14 Comparación de los perfiles de expresión de las zonas regulatorias de los genes STY0034, STY0035, STY0036 (*ltrR*), STY0038, STY0039, STY0040 y STY0041 en MM-N y LB+ 5% de deoxicolato a una DO₅₉₅ 0.6. Se muestra una mayor actividad transcripcional en medio mínimo obteniéndose diferentes patrones de expresión.

LtrR además de participar en la resistencia a deoxicolato de sodio, también se ha demostrado que incrementa sus niveles de expresión en presencia de pH 7.5. Como se demostró que STY0035 y *ltrR* están regulados negativamente por H-NS, decidimos evaluar la actividad transcripcional de STY0035 en MM-N con 200 mM de Tris-HCl en dos condiciones de pH: 6.0 y 7.5. De igual forma se midieron los niveles de expresión de la fusión pKK8/STY0034. No se ha determinado la actividad específica CAT en pH 6.0 y 7.5 de las fusiones pKK9/STY0038, pKK9/STY0039, pKK9/STY0040 y pKK9/STY0041.

Como se observa en la figura 12 A los niveles de expresión de STY0034 en pH 6.0 y pH 7.5 son muy similares en cada punto del crecimiento bacteriano, esto nos sugiere que la expresión del gen STY0034 es independiente del pH. La fusión pKK8/STY0035 muestra un incremento en los niveles de expresión cuando el pH del medio permanece en 7.5 para lograr esto se utilizó como amortiguador 200 mM de Tris-HCl, sin embargo, la actividad transcripcional disminuye en un pH de 6.0 (Fig. 15 B). Esto nos sugiere que STY0035, así como *ltrR* están involucrados en el mismo mecanismo de acción en pH 7.5.

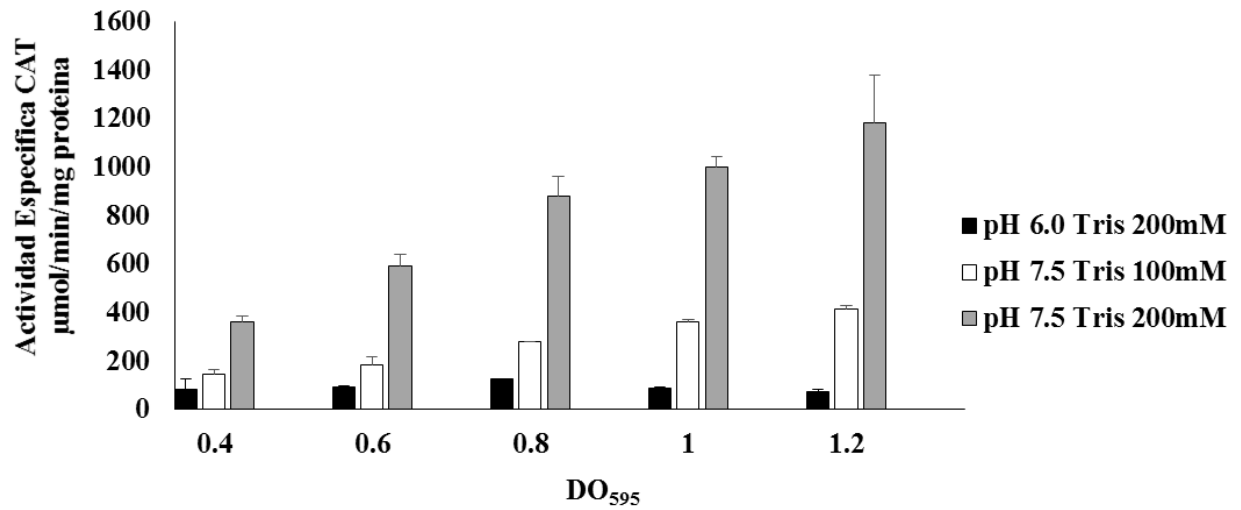
A

MM-N
S. Typhi IMSS-1+pKK8/STY0034



B

MM-N
S. Typhi IMSS-1 +pKK8/STY0035



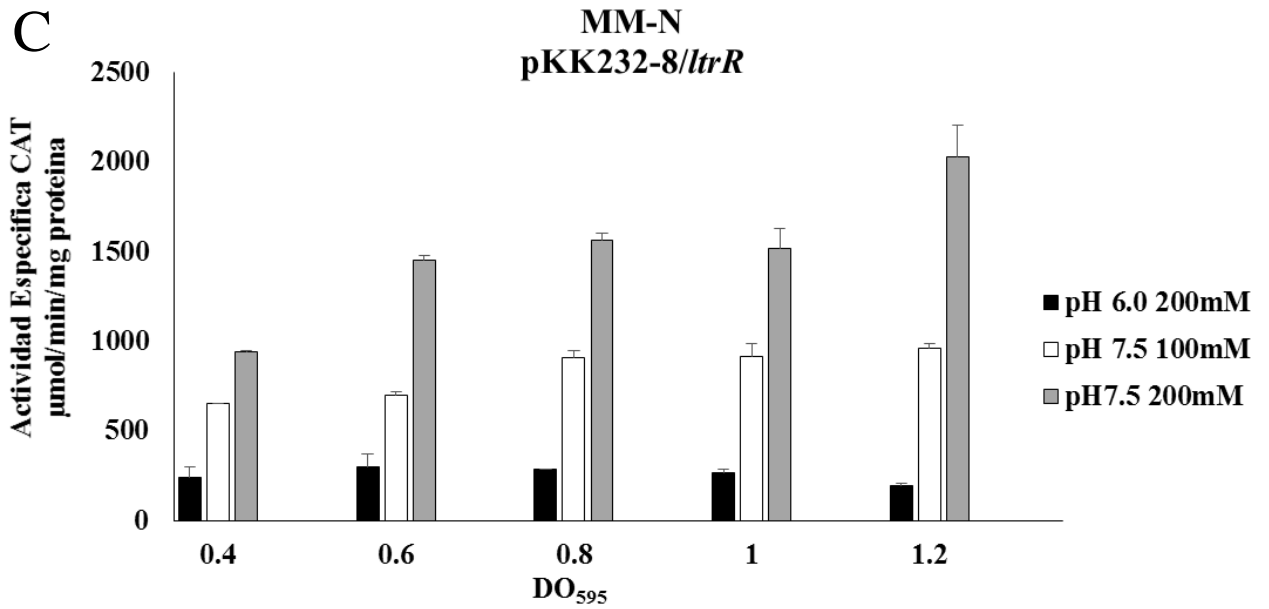


Fig. 15 Perfil transcripcional de los genes STY0034 (A), STY0035 (B) y *ltrR* (C) en MM-N en pH 6.0 y 7.5.

Estos resultados nos indican que el gen STY0035 está vinculado con *ltrR* en la resistencia a deoxicolato de sodio, además de que ambos genes están regulados negativamente por H-NS e incrementan sus niveles de expresión en presencia de un pH ligeramente alcalino.

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Salmonella es una bacteria capaz de colonizar diferentes hábitats durante su ciclo de vida. Esto lo logra debido a que cuenta con diferentes genes que le permiten crecer en determinadas condiciones, uno de estos escenarios es el intestino y la vesícula biliar donde las concentraciones de sales biliares son elevadas.

Salmonella Typhi posee el regulador LtrR, que es el encargado de controlar la expresión de *ompR*; posteriormente OmpR activa la transcripción del gen *ompC* y la proteína correspondiente se encuentra involucrada a la resistencia a sales biliares. En este trabajo se ha demostrado que el gen *ltrR* codifica para 2 proteínas LtrR2 y LtrR1. Se observó en geles de 2D que cada una de estas proteínas es indispensable para sintetizar de manera indirecta diferentes isoformas de las proteínas de membrana externa OmpC y OmpF. Ambas proteínas LtrR2 y LtrR1 se encuentran involucradas en producir las concentraciones adecuadas de OmpC para sobrevivir en la presencia de deoxicolato de sodio.

De manera interesante el gen *ltrR* se encuentra localizado dentro del grupo de genes STY034-STY0041 que comparten el mismo contenido de G-C. Evaluamos si estos genes son fundamentales para sobrevivir en presencia de la sal biliar deoxicolato de sodio. Mediante mutantes de cada uno de los genes del clúster, descubrimos que cada gen participa de alguna forma en el crecimiento de *Salmonella* Typhi en presencia de esta sal biliar y su perfil de porinas OmpC y OmpF se ve alterado, razón por la cual no crecen en deoxicolato de sodio. Complementaciones de cada mutante utilizando únicamente un plásmido que expresa el gen correspondiente a cada mutación no recuperan el crecimiento en deoxicolato de sodio ni su perfil silvestre de porinas. Sin embargo, complementaciones usando pACY/*ompR* (un regulador involucrado en la síntesis de porinas) más un plásmido de bajo y de mediano número de copia expresando cada gen de forma individual muestra un restablecimiento silvestre en cuanto al perfil de porinas, sin embargo, ninguna mutante crece en deoxicolato de sodio excepto la mutante STY0040. Esta mutante fue complementada con *ompR* y STY0040 y STY0041 debido a que estos dos últimos genes se

encuentran organizados en operón. Esta cepa es capaz de restablecer su perfil de proteínas de membrana externa y crecer en deoxicolato de sodio. Lo anterior indica que en forma conjunta STY0040 y *ompR* están implicados en la resistencia a deoxicolato de sodio.

Basado en lo anterior hemos decidido utilizar un plásmido de alto número de copia para complementar cada mutante del clúster STY0034-STY0041 con su gen correspondiente y así restablecer la resistencia a deoxicolato de sodio. De manera interesante el incremento de la porina OmpC en la complementación de cada mutante del clúster utilizando únicamente el plásmido pACY/*ompR* no influyó en el crecimiento de la bacteria en presencia de deoxicolato de sodio. Es probable que el clúster se encuentre involucrado en el control de la síntesis de OmpC a través de OmpR o a través de la regulación directa del promotor de *ompC*. Otra hipótesis es que los genes del clúster STY0034-STY0041 estén involucrados específicamente en la síntesis de alguna de las isoformas de la porina OmpC que está involucrada en la resistencia a deoxicolato de sodio.

Experimentos de geles de dos dimensiones, así como experimentos de transcripción de *ompR* son necesarios para determinar que la cepa complementada restablece las seis isoformas de OmpC y los perfiles transcripcionales de *ompR* restablecen sus valores al nivel de la cepa silvestre. Estos datos son necesarios para corroborar que realmente los niveles de proteína y transcripcional son similares a la cepa silvestre. Evidentemente la proteína OmpC tiene un papel fundamental en la resistencia a deoxicolato de sodio ya que su ausencia o disminución en la membrana externa de *S. Typhi* provoca sensibilidad a este compuesto. Es posible que esta porina impida el paso del deoxicolato de sodio y esta sea la razón por la cual la bacteria es resistente. Experimentos sobreexpresando la porina OmpC son necesarios con el fin de evaluar si cantidades mayores de esta proteína en la membrana externa de *S. Typhi* aumenta la resistencia a deoxicolato de sodio.

Otro aspecto que se exploró en este estudio es la regulación del clúster STY0034-STY0041 se generaron fusiones de cada uno de los genes y establecimos que el gen STY0035 y el gene STY0036 se encuentran ligados funcionalmente ya que ambas mutantes presentan fenotipos similares: estas mutantes no crecen en deoxicolato de sodio, son reguladas por pH

en medio mínimo N y el regulador global H-NS regula de manera negativa cada uno de sus promotores.

Por último, en este trabajo se determinó que los elementos genéticos STY0034-STY0041 son esenciales para que *S. Typhi* sobreviva en presencia de sales biliares. También determinamos que el regulador global H-NS y el pH modulan la expresión de STY0035 y STY0036.

Finalmente es esencial elucidar el mecanismo molecular mediante el cual el cluster STY0034-STY0041 se encuentra involucrado en la resistencia a sales biliares. Evidentemente este cluster forme parte de la maquinaria de regulación y función estructural de la resistencia a deoxicolato de sodio. Esto se basa en que la proteína hipotética STY0035, el regulador STY0036 y la proteína de membrana externa STY0034 se expresan en deoxicolato de sodio y proporcionan sensibilidad a *S. Typhi*. En conjunto estos tres elementos podrían funcionar en la resistencia a deoxicolato de sodio. Con respecto a STY0038-STY0041 se requieren más estudios ya que no se expresan en ninguna condición evaluada, sin embargo, las mutantes son sensibles a deoxicolato de sodio, esto podría ser otro conjunto de genes involucrados en la resistencia a este compuesto. Es importante mencionar que el análisis de más de una megabase del genoma de *S. Typhi* demuestra que existen diferentes fenotipos a la resistencia a deoxicolato de sodio, es decir existen genes que inducen una mayor resistencia a deoxicolato de sodio, otros elementos genéticos proporcionan un fenotipo silvestre y finalmente existen los genes que le proporcionan una sensibilidad más pronunciada al deoxicolato de sodio a *S. Typhi*. En ese sentido es relevante evaluar a que categoría de las antes mencionadas está incluido el cluster STY0034-STY0041. El identificar que esta bacteria posee diversos sistemas para contender con diferentes concentraciones de deoxicolato de sodio es lógico ya que este patógeno enfrenta diversas concentraciones de deoxicolato de sodio en el intestino y en la vesícula biliar, razón por la cual posee diferentes sistemas para contender con este compuesto tóxico. Requerimos profundizar en el estudio de la resistencia a deoxicolato de sodio con el fin de describir un modelo global genómico que nos permita entender la resistencia a sales biliares.

8. PERSPECTIVAS

Los resultados nos indican que cada uno de los genes del clúster STY0034-STY004 están involucrados en la síntesis de proteínas de membrana externa en MM-N y en la resistencia de deoxicolato de sodio, es importante continuar con la búsqueda de nuevas condiciones de estrés en los cuales estos genes participan durante el ciclo de vida de *Salmonella Typhi*. Para ello se debe evaluar las fusiones transcripcionales de STY0034, STY0038, STY0039, STY0040 y STY0041 en otras condiciones de estrés como pH ácido y osmolaridad. Además de realizar un gel de 2D de las cepas STY0040 y STY0041 para determinar el perfil de proteínas de membrana externa que presenta y así determinar el papel de estos genes en la síntesis de estas porinas.

9. REFERENCIAS

- Bang I, Kim B, Foster J and Park Y. (2000). OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*. 182: 2245-2252.
- Bäumlér J, Tsolis R and Heffron F. (1996). Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella* Typhimurium. *Infection and Immunity*. 64:1862-1865.
- Bearson B, Wilson L and Foster J. (1998). A low pH inducible, PhoPQ dependent acid tolerance response protects *Salmonella* Typhimurium against inorganic acid stress. *Journal of Bacteriology*. 180: 2409-2417.
- Bernstein C, Bernstein H, Payne C, Beard S and Schneider J. (1999). Bile salt activation of stress response promoters in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*. 39:68-72.
- Farmer J. (1985). Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 21: 46-76.
- Cowan S, Schirmer T, Rummel G, Steiert M, Ghosh R, Pauptit R, Jansonius J and Rosenbusch J. (1992). Crystal structures explain functional properties of two *Escherichia coli* porins. *Nature*. 358:727-733.
- Fábrega A and Vila J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation *Journal of Clinical Microbiology Reviews*. 26: 308-341.

- Fajardo D, Cheung J, Ito C, Sugawara E, Nikaido H and Misra R. (1998). Biochemistry and regulation of a novel *Escherichia coli* K-12 porin protein, OmpG, which produces unusually large channels. *Journal of Bacteriology*. 180:4452-9.
- Feng X, Oropeza R and Kenney L. (2003). Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Molecular Microbiology*. 48:1131-1143.
- Foley M, O’Flaherty S, Barrangou R and Theriot C. (2019) Bile salt hydrolases: Gatekeepers of bile acid metabolism and hostmicrobiome crosstalk in the gastrointestinal tract. *PLoS Pathogens*.15(3): e1007581.
- Foster J and Hall H. (1991). Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Bacteriology*. 173:5129-5135.
- Galán J and Collmer A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*. 284:1322-1328.
- Galán J and Curtiss R. (1989). Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86:6383-6387.
- Galán J. (1999). *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 17:53-86.
- Gil F, Ipinza F, Fuentes J, Fumeron R, Villarreal J, Aspée A, Mora G, Vásquez C and Saavedra C. (2007). The *ompW* (porin) gene mediates methyl viologen

(paraquat) efflux in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Research in Microbiology*. 158:529-536.

- Grimont P and Weill F. (2007) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th ed. WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur. Paris, France.

- Hall H and Foster J. (1996). The role of *fur* in the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *Journal of Bacteriology*. 178:5683-5691.

- Hofmann A. (1999). The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Archives of Internal Medicine*. 159:2647-2658.

- Huang D and DuPont H. (2005). Problem pathogens: extra-intestinal complications of *Salmonella enterica* serotype Typhi infection. *Lancet Infectious Diseases*. 5:341-8.

- Janakiraman A and Slauch J. (2000). The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Microbiology*. 35:1146-1155.

- Johnson R, Mylona E and Frankel G. (2018). Typhoidal *Salmonella*: Distinctive virulence factors and pathogenesis. *Cellular Microbiology*. 20: e12939

- Jones B, Ghori N and Falkow S. (1994). *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *Journal Experimental Medicine*. 180:15-23.

- Jones C and Holland I. (1985). Role of the SulB (FtsZ) protein in division inhibition during the SOS response in *Escherichia coli*: FtsZ stabilizes the inhibitor SulA in maxicells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 82:6045-6049.
- Kaur J and Jain S. (2012). Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. Microbiological Research. 167:199-210.
- Kohbata S, Yokoyama H and Yabuuchi E. (1986). Cytopathogenic effect of *Salmonella* Typhi on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study. Microbiology and Immunology. 30:1225-1237.
- Kristoffersen S, Ravnum S, Tourasse N, Okstad O, Kolsto A and Davies W. (2007). Low concentrations of bile salts induce stress responses and reduce motility in *Bacillus cereus* ATCC14579. Journal of Bacteriology. 189:5302-5313.
- Lee I, Lin J, Hall H, Bearson B and Foster J. (1995). The stationary phase sigma factor S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. Molecular Microbiology. 17:155-167.
- Leoni A and Hensel M. (2012). Interactions of *Salmonella enterica* with dendritic cells. Virulence. 3:660-667.
- Mills D, Bajaj V, Lee C. (1995). A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella* Typhimurium invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. Molecular Microbiology. 15:749-759.
- Nikaido H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 67:593-656.

- Nixon B, Ronson C and Ausubel F. (1986). Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 83:7850-7854.
- Pérez-Rueda E. and Collado-Vides J. (2000). The repertoire of DNA binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. Nucleic Acids Research. 28:1838-1847.
- Perkins T, Kingsley R, Fookes M, Gardner P, James K and Yu L. (2009). A strand-specific RNASeq analysis of the transcriptome of the typhoid bacillus *Salmonella* Typhi. PLoS Genetics. 5: e1000569.
- Pfaller M, Baron E and Murray P. (1999). Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington, DC: ASM Press.
- Pickard D, Li J, Roberts M, Maskell D, Hone D and Levine M. (1994). Characterization of defined *ompR* mutants of *Salmonella* Typhi: *ompR* is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression. Infection and Immunity. 62:3984-3993.
- Prieto A, Ramos-Morales F and Casadesus J. (2006). Repair of DNA damage induced by bile salts in *Salmonella enterica*. Genetics. 174:575-584.
- Ridlon J, Kang, D and Hylemon P. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. Journal of Lipid Research. 47:241-259.
- Rince A, Le Breton Y, Verneuil N, Giard J, Hartke A and Auffray Y. (2003). Physiological and molecular aspects of bile salt response in *Enterococcus faecalis*. International Journal of Food Microbiology. 88:207-213.

- Ronson C, Nixon B and Ausubel F. (1987). Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Cell*. 49:579-581.
- Ruiz L, Coute Y, Sanchez B, de los Reyes-Gavilan C, Sanchez J and Margolles A. (2009). The cell-envelope proteome of *Bifidobacterium longum* in an in vitro bile environment. *Microbiology*. 155:957-967.
- Santiviago C, Fuentes J, Bueno S, Trombert A, Hildago A, Socias L, Youderian P and Mora G. (2002). The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *smvA*, *yddG* and *ompD* (porin) genes are required for the efficient efflux of methyl viologen. *Molecular Microbiology*. 46:687-698.
- Snyder M. (1970). Typhoid fever: pathogenesis and immunologic control. *The New England Journal of Medicine*. 283(13): 686-691.
- Tommassen J. (2010). Assembly of outer-membrane proteins in bacteria and mitochondria. *Microbiology*. 156:2587-2596.
- Villarreal JM, Becerra-Lobato N, Rebollar-Flores JE, Medina-Aparicio L, Carbajal-Gomez E, Zavala-Garcia ML, Vazquez A, Gutierrez-Rios RM, Olvera L, Encarnacion S, Martinez-Batallar AG, Calva E and Hernandez-Lucas I. (2014). The *Salmonella enterica* serovar Typhi *ltrR-ompR-ompC-ompF* Genes are Involved in Resistance to the Bile Salt Sodium Deoxycholate and in Bacterial Transformation *Molecular Microbiology*. 92:1005-1024.
- Walthers D, Go A and Kenney L. (2005). Regulation of porin gene expression by the Two-Component Regulatory System EnvZ/OmpR. *Bacterial and Eukaryotic Porins: Structure, Function, Mechanism*. Chapter 1:1-24.

- Weiss M, Abele U, Weckesser J, Welte W, Schiltz E and Schulz G. (1991).
Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science*.
254:1627-1630.