



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Regulación de la expresión y papel en virulencia de los genes *grhD1* y *grhD2* de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. MARÍA MAGDALENA BANDA HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL

Dr. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. CINTHIA ERNESTINA NÚÑEZ LÓPEZ
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. JOSÉ ANTONIO IBARRA GARCÍA
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN

Cuernavaca, Mor. Junio, 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.

El presente trabajo de investigación se realizó en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán y como parte del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la misma Universidad.

El Comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dra. Cinthia Ernestina Núñez López

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. José Antonio Ibarra García

(Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN)

El jurado designado para el Examen de Grado estuvo integrado por:

Dr. Baltazar Becerril Luján

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dra. Clarita Olvera Carranza

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dra. Gloria Soberón Chávez

(Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)

Dr. Daniel Genaro Segura González

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. Mario Soberón Chávez

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Para la realización de esta investigación, la alumna recibió beca CONACyT (No. CVU/Becario: 447726/403748), así como apoyo de los proyectos PAPIIT-UNAM (IN203415 e IN202418) y CONACyT-CB (254531).

Con todo mi amor para las personas que me han apoyado incondicionalmente toda la vida, que me han motivado a seguir mis sueños y que me han enseñado que hay que trabajar para alcanzarlos. Gracias por tantos momentos de felicidad que me han brindado y por ser mi fortaleza en momentos difíciles. Por todo esto y más, esta tesis se las dedico a ustedes:

Mis padres, Irma y Magdaleno

Mis hermanos, Juan Carlos y David

AGRADECIMIENTOS

A mis sobrinos, Juan Carlos, Denzel Iván y Juan Pablo, por el cariño incondicional que me han brindado y por estar siempre presentes en mi vida aún en la distancia.

A mis cuñadas, Susana e Imelda, por el apoyo y amistad que me han brindado durante todos estos años.

A mis amigas en la distancia, Chelo, Erika y América, que estuvieron apoyándome y al pendiente de mí durante estos años. A Rubiceli y Crispín, con quienes compartí excelentes momentos mientras formamos parte del mismo grupo de investigación, gracias por brindarme su amistad, su apoyo y por seguir siendo parte de mi vida. A Jessica, Claudia y Liliana, por su amistad y por compartir conmigo buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

Al Dr. Víctor Bustamante, por darme la oportunidad de ser parte de su grupo y de realizar este proyecto bajo su dirección. Gracias por el apoyo, orientación y enseñanzas brindadas durante todos estos años.

A la Dra. Cinthia Núñez y el Dr. José Antonio Ibarra, por formar parte de mi comité tutorial, y por brindarme consejos y observaciones que enriquecieron este trabajo.

A los miembros de mi jurado de tesis, la Dra. Clarita Olvera, la Dra. Gloria Soberón, el Dr. Baltazar Becerril, el Dr. Mario Soberón y el Dr. Daniel Segura, por sus comentarios y críticas que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. José Luis Puente y al Dr. Edmundo Calva, por el apoyo y comentarios brindados hacia este trabajo. Al Biol. Francisco Javier Santana, a la Dra. Alejandra Vázquez, al M. C. Marcos Fernández y a la Dra. Lucía Perezgasga, por el apoyo técnico brindado. A la Sra. Rebeca, a la Sra. Mariana y a Mario, por su gran labor en el laboratorio, su trabajo y apoyo fue fundamental para el desarrollo de este trabajo.

A todos los que han formado parte del grupo Bustamente, por su apoyo y por brindarme su amistad. A todos los miembros del laboratorio No. 2 del IBt-UNAM, que siempre me brindaron su apoyo, cariño y una amistad sincera.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), por el apoyo económico para la asistencia a congresos a nivel nacional e internacional.

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
2. RESUMEN.....	13
3. ABSTRACT.....	14
4. INTRODUCCIÓN.....	15
4.1. El género <i>Salmonella</i> y su importancia biológica.....	15
4.2. Mecanismo de patogénesis de <i>Salmonella</i>	15
4.3. Factores de virulencia de <i>Salmonella</i>	18
4.3.1. Flagelo.....	18
4.3.2. Adhesinas.....	19
4.3.3. Sistema de secreción tipo III.....	19
4.4. Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i>	20
4.4.1. SPI-1.....	20
4.4.1.1. HilD.....	23
4.4.1.2. SprB.....	24
4.4.2. SPI-2.....	24
4.5. Sistema de dos componentes PhoQ/PhoP.....	26
5. ANTECEDENTES.....	28
6. HIPÓTESIS.....	32
7. OBJETIVOS.....	32
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
8.1. Medios de cultivo.....	40
8.2. Construcción de plásmidos.....	41
8.3. Purificación de plásmidos por “miniprep”.....	43
8.4. Preparación de células electrocompetentes.....	44
8.5. Electroporación.....	44
8.6. Construcción de cepas mutantes.....	45
8.7. Construcción de cepas que expresan genes etiquetados con el epítipo de FLAG.....	46
8.8. Transducción con el fago P22.....	47
8.9. Cultivos bacterianos para cuantificar la expresión de los genes.....	48
8.10. Cuantificación de la actividad enzimática específica de CAT	

(Cloranfenicol Acetil Transferasa).....	50
8.11. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot.....	51
8.12. Perfil de proteínas secretadas.....	52
8.13. Ensayos de retardo en gel (EMSA's; Electrophoretic Mobility Shift Assays).....	52
8.14. Ensayo de movilidad en agar.....	54
8.15. Ensayo de invasión a células HeLa, macrófagos y fibroblastos.....	54
8.16. Ensayo de replicación/sobrevivencia en células epiteliales HeLa y macrófagos.....	56
8.17. Ensayo de adherencia a células HeLa.....	56
8.18. Experimentos de infección en ratones.....	57
8.19. Análisis estadístico.....	58
9. RESULTADOS.....	59
9.1. Regulación y papel en virulencia del gen <i>grhD1</i> (SL1872).....	59
9.1.1. HilD regula positivamente la expresión de <i>grhD1</i> en medio LB.....	59
9.1.2. PhoP regula positivamente la expresión de <i>grhD1</i> en medio LB y medio mínimo.....	62
9.1.3. HilD regula positiva e indirectamente la expresión de <i>phoP</i> en medio LB.....	66
9.1.4. HilD y PhoP controlan independientemente la expresión de <i>grhD1</i>	68
9.1.5. H-NS reprime la expresión de <i>grhD1</i>	72
9.1.6. GrhD1 se requiere para la invasión de <i>S. Typhimurium</i> a células hospederas.....	73
9.1.7. GrhD1 contribuye a la respuesta inflamatoria intestinal producida por la infección de <i>S. Typhimurium</i> en ratón.....	79
9.1.8. GrhD1 no se secreta y no se requiere para la secreción de las proteínas de SPI-1 o para la movilidad de <i>S. Typhimurium</i>	80
9.2. Regulación y papel en virulencia del gen <i>grhD2</i> (SL1770).....	84
9.2.1. HilD regula de manera positiva la expresión de <i>grhD2</i> a través de SprB.....	84
9.2.2. HilD induce directamente la expresión de <i>sprB</i> al desplazar a H-NS de su región reguladora.....	89

9.2.3.	H-NS no está involucrado en la expresión de <i>grhD2</i> en medio LB.....	93
9.2.4.	GrhD2 se requiere para la invasión de <i>S. Typhimurium</i> a células hospederas.....	94
9.2.5.	GrhD2 se requiere para la adherencia de <i>S. Typhimurium</i> a células HeLa.....	97
9.2.6.	La ausencia de GrhD2 aumenta la replicación de <i>S. Typhimurium</i> dentro de macrófagos, no así en células HeLa.....	98
9.2.7.	GrhD2 se requiere para la colonización intestinal de <i>S. Typhimurium</i> en ratones.....	101
9.2.8.	GrhD2 es secretada al medio de cultivo por <i>Salmonella</i> pero no por <i>E. coli</i> K-12.....	102
9.2.9.	Las cascada reguladora HilD-SprB controla la expresión de los genes <i>slrP</i> y <i>ugtL</i>	107
10.	DISCUSIÓN.....	109
11.	CONCLUSIONES.....	118
12.	PERSPECTIVAS.....	120
13.	REFERENCIAS.....	121
14.	ANEXO Artículos publicados del Proyecto de Doctorado.....	130

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismo de infección de <i>Salmonella</i>	17
Figura 2. Organización genética de SPI-1.....	21
Figura 3. Regulación de la expresión de los genes de SPI-1.....	22
Figura 4. Organización genética de SPI-2.....	25
Figura 5. Regulación de la expresión de los genes de SPI-2.....	26
Figura 6. Los genes <i>grhD1</i> y <i>grhD2</i> se expresan por dos diferentes mecanismos, uno dependiente y el otro independiente de HilD.....	28
Figura 7. Contexto genómico del gen <i>grhD1</i> en <i>Salmonella</i>	29
Figura 8. Contexto genómico del gen <i>grhD2</i> en <i>S. Typhimurium</i> y de sus ortólogos en <i>S. bongori</i> y <i>E. coli</i>	30
Figura 9. HilD regula positivamente la expresión de GrhD1.....	59
Figura 10. HilD no se une a la región reguladora de <i>grhD1</i>	60
Figura 11. La expresión de <i>grhD1</i> mediada por HilD no requiere de otro regulador codificado en SPI-1, o de RtsA, SsrB o FlhDC.....	61
Figura 12. PhoP activa la expresión de <i>grhD1</i>	63
Figura 13. PhoP y SlyA regulan positivamente la expresión de GrhD1 en diferentes condiciones de crecimiento.....	64
Figura 14. PhoP se une específicamente a la región reguladora de <i>grhD1</i>	65
Figura 15. HilD regula de forma indirecta la expresión de <i>phoP</i>	67
Figura 16. HilD y PhoP inducen la expresión de <i>grhD1</i> en medio LB de manera independiente.....	69
Figura 17. Dos diferentes promotores regulados por HilD y PhoP inducen la expresión de <i>grhD1</i>	71
Figura 18. H-NS reprime directamente la expresión de <i>grhD1</i>	73
Figura 19. Se requiere de GrhD1 para la invasión de <i>S. Typhimurium</i> a células HeLa, macrófagos y fibroblastos.....	74
Figura 20. La sobre-expresión de GrhD1 disminuye la invasión de <i>S. Typhimurium</i> a células HeLa.....	76
Figura 21. Generación de las cepas mutantes Δ <i>grhD1</i> y la cepa complementada Δ <i>grhD1</i> + <i>grhD1-FLAG-kan</i> , y su fenotipo de invasión.....	77
Figura 22. No se requiere de GrhD1 para la replicación/sobrevivencia de <i>S. Typhimurium</i> en células HeLa y macrófagos.....	78

Figura 23. GrhD1 contribuye a la respuesta inflamatoria intestinal inducida por <i>S. Typhimurium</i> en ratón.....	80
Figura 24. Estructura secundaria predicha para la proteína GrhD1.....	81
Figura 25. GrhD1 es una proteína que no se secreta.....	81
Figura 26. GrhD1 no se requiere para la actividad del SST3-1 o para la movilidad.....	83
Figura 27. HilD regula positivamente la expresión de GrhD2.....	84
Figura 28. HilD no se une a la región reguladora del gen <i>grhD2</i>	85
Figura 29. HilD y SprB controlan positivamente la expresión del gen <i>grhD2</i> , no así HilC, HilA, InvF, RtsA, SsrB, SinR o FlhDC.....	86
Figura 30. HilD actúa a través de SprB para activar la expresión del gen <i>grhD2</i>	87
Figura 31. SprB no requiere otro regulador de <i>S. Typhimurium</i> para inducir la expresión del gen <i>grhD2</i> en <i>E. coli</i> K12.....	88
Figura 32. HilD regula positiva y directamente la expresión del gen <i>sprB</i>	90
Figura 33. HilD desplaza a H-NS de la región reguladora de <i>sprB</i>	92
Figura 34. La expresión de <i>grhD2</i> no es regulada por H-NS.....	93
Figura 35. Se requiere de GrhD2 para la invasión de <i>S. Typhimurium</i> a células HeLa y macrófagos.....	94
Figura 36. Generación de las cepas mutantes Δ <i>grhD2</i> y de la cepa complementada Δ <i>grhD2</i> + <i>grhD2</i> -FLAG-kan y su fenotipo de invasión.....	95
Figura 37. La movilidad no está involucrada en el defecto de invasión de la mutante Δ <i>grhD2</i>	96
Figura 38. Se requiere de GrhD2 para la adherencia de <i>S. Typhimurium</i> a células HeLa.....	98
Figura 39. La ausencia de GrhD2 promueve una hiper-replicación de <i>S. Typhimurium</i> en macrófagos, no así en células HeLa.....	99
Figura 40. Se requiere de GrhD2 para el control de la replicación de <i>S. Typhimurium</i> en macrófagos.....	100
Figura 41. GrhD1 contribuye a la infección intestinal causada por <i>S. Typhimurium</i> en ratón.....	101
Figura 42. Estructura secundaria predicha para la proteína GrhD2.....	102
Figura 43. La proteína GrhD2 se secreta en <i>S. Typhimurium</i> de manera independiente a los SST3-1 y SST3-2, y no se secreta en <i>E. coli</i> K-12.....	104

Figura 44. La proteína YobH de <i>E. coli</i> se secreta por <i>E. coli</i> K-12 y por <i>S. Typhimurium</i>	105
Figura 45. GrhD2 y YobH se secretan en ausencia de los reguladores HilD, OmpR o FlhDC.....	106
Figura 46. GrhD2 y YobH se secretan en <i>S. bongori</i>	107
Figura 47. HilD regula a través de SprB la expresión de los genes <i>slrP</i> y <i>ugtL</i>	108
Figura 48. Modelo de regulación y papel del gen <i>grhD1</i> en la virulencia de <i>S. Typhimurium</i> SL1344.....	110
Figura 49. Modelo de regulación y papel del gen <i>grhD2</i> en la virulencia de <i>S. Typhimurium</i> SL1344.....	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas.....	33
Tabla 2. Plásmidos utilizados.....	35
Tabla 3. Oligonucleótidos empleados.....	37
Tabla 4. Mezclas utilizadas durante la transducción con el fago P22.....	48

1. LISTA DE ABREVIATURAS

ASB	Albúmina de suero bovino
Amp ^R	Resistente a ampicilina
ATP	Adenosín trifosfato
°C	Grados centígrados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
g	Fuerza centrífuga relativa
h	Hora
H-NS	Proteína tipo histona para la estructuración del nucleóide
Ig	Inmunoglobulina
kb	Kilobase
Km ^R	Resistente a kanamicina
kV	Kilovoltios
M	Molar
µg	Microgramo
mg	Miligramo
Mg ²⁺	Ión magnesio
min	Minuto
µl	Microlitro
ml	Mililitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
µmol	Micromol
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidad de infección
MQ	Milli-Q
ms	Milisegundo
ng	Nanogramo
nm	nanómetro
nM	Nanomolar
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos salinos

PBS-T	Amortiguador de fosfatos salinos con Tween
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
sRNA	RNA pequeño
Stp ^R	Resistente a estreptomicina
Tet ^R	Resistente a tetraciclina
UFCs	Unidades formadoras de colonia
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Voltios

2. RESUMEN

Cuando *Salmonella* crece en el medio rico en nutrientes “Lysogeny broth” (LB), el regulador transcripcional HilD, que pertenece a la familia AraC, induce la expresión de varios genes dentro y fuera de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1), los cuales se requieren principalmente para la invasión de *Salmonella* a células hospederas. Por otro lado, cuando *Salmonella* crece en medios mínimos, el sistema de dos componentes PhoP/Q, activa la expresión de genes necesarios para la replicación de *Salmonella* dentro de células hospederas, como los genes de SPI-2. Previamente se reportó que los genes hipotéticos *SL1872* y *SL1770* se co-expresan con los genes de SPI-1. En este trabajo, demostramos que HilD regula la expresión de *SL1872* y *SL1770* cuando *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) crece en LB. Por lo tanto, nombramos a *SL1872* y *SL1770* como *grhD1* y *grhD2*, respectivamente, por ‘gen regulado por HilD’. HilD induce la expresión de *grhD1* a través de un factor desconocido, el cual contrarresta la represión que ejerce el regulador H-NS sobre *grhD1*. Además, encontramos que PhoP controla positivamente la expresión de *grhD1*, de manera independiente a HilD, cuando *S. Typhimurium* crece en medio LB o en medio mínimo N (MM-N). También encontramos que HilD actúa a través del regulador SprB para inducir la expresión de *grhD2*. Consistente con esto, demostramos que HilD controla directamente la expresión de *sprB* al contrarrestar la represión que ejerce H-NS sobre el promotor de este gen. Asimismo, demostramos que los genes *grhD1* y *grhD2* son requeridos para la invasión de *S. Typhimurium* a células hospederas, y que *grhD2* también es requerido para la adhesión a células epiteliales. De manera interesante, nuestros resultados revelan que *grhD1* es requerido para la respuesta inflamatoria intestinal causada por *S. Typhimurium* en ratones, y resultados preliminares indican que *grhD2* es requerido para la colonización a ratones. Nuestros resultados indican que GrhD1 es una proteína que no se secreta, contrariamente, GrhD2 se secreta al medio de cultivo por *Salmonella*, pero no por *Escherichia coli*, y de manera independiente a los sistema de secreción tipo III de *Salmonella*. YobH, la proteína ortóloga de GrhD2 en *E. coli* K-12, también se secreta, incluso en *Salmonella*. Así, nuestros resultados revelan dos nuevos factores de virulencia de *Salmonella* y muestran como diferentes reguladores controlan su expresión.

3. ABSTRACT

When *Salmonella* is grown in the nutrient-rich lysogeny broth (LB), the AraC-like transcriptional regulator HilD induces the expression of many genes within and outside the *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1), which are mainly required for *Salmonella* invasion of host cells. In addition, when *Salmonella* is grown in minimal media, the two-component system PhoP/Q activates the expression of genes necessary for *Salmonella* replication inside host cells, such as the SPI-2 genes. Previously, it was reported that the *SL1872* and *SL1770* hypothetical genes are co-expressed with the SPI-1 genes. In this work we demonstrate that HilD regulates the expression of both *SL1872* and *SL1770* when *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) is grown in LB. Therefore, we named *SL1872* and *SL1770* as *grhD1* and *grhD2*, respectively, for 'gene regulated by HilD'. HilD regulates *grhD1* through an unknown factor, which counteracts the repression exerted by the H-NS regulator on *grhD1*. Furthermore, we found that PhoP positively controls the expression of *grhD1*, independently of HilD, when *S. Typhimurium* is grown in LB or N-minimal medium (N-MM). We also found that HilD acts through SprB to induce expression of *grhD2*. Additionally, we demonstrate that HilD controls the expression of *sprB* by directly counteracting H-NS-mediated repression exerted on the promoter of this gene. Moreover, we demonstrate that both *grhD1* and *grhD2* are required for the invasion of *S. Typhimurium* into host cells, and that *grhD2* is also involved in adhesion to epithelial cells. Interestingly, our results reveal that *grhD1* is required for the intestinal inflammatory response caused by *S. Typhimurium* in mice and preliminary results indicate that *grhD2* is required for the intestinal colonization of mice. Our results indicate that GrhD1 is a protein that is not secreted; conversely, GrhD2 is secreted into the culture medium by *Salmonella*, but not by *Escherichia coli*, and independently of the two type III secretion systems of *Salmonella*. YohH, the orthologous protein of GrhD2 in *E. coli* K-12, is also secreted, even in *Salmonella*. Thus, our results reveal two novel virulence factors of *Salmonella* and show how different regulators control their expression.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. El género *Salmonella* y su importancia biológica

El género *Salmonella*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, agrupa a bacterias Gram-negativas con forma de bacilo y anaerobias facultativas (Coburn *et al.*, 2007). Este género se divide en dos diferentes especies, *S. enterica* y *S. bongori*. A su vez, basado principalmente en su secuencia genómica y propiedades bioquímicas, *S. enterica* se clasifica en seis subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). Estas subespecies son clasificadas en más de 2500 serovares con base en los antígenos O (lipopolisacárido) y H (flagelar) (Brenner *et al.*, 2000).

S. enterica agrupa a bacterias patógenas de humanos y animales que causan una variedad de enfermedades, que van desde infecciones gastrointestinales localizadas que producen diarrea, hasta infecciones sistémicas severas, como la fiebre tifoidea (Haraga *et al.*, 2008). Aunque existen reportes de casos donde *S. bongori* ha infectado a humanos (Giammanco *et al.*, 2002), esta especie está predominantemente asociada con animales poiquiloterms, como reptiles, anfibios y peces (Fierer and Guiney, 2001). *S. enterica* subespecie I (*enterica*) se ha identificado en el 99% de los aislados de humanos (Eng *et al.*, 2015). Entre las subespecies de *S. enterica* se han identificado serovares restringidos a un hospedero, como *S. Typhi* y *S. Paratyphi A*, que causan fiebre entérica o tifoidea, y serovares que tienen un amplio rango de hospederos, como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, que son la causa más común de gastroenteritis (Uzzau *et al.*, 2000).

Se estima que *Salmonella* causa aproximadamente 10 a 20 millones de casos de fiebre tifoidea al año, que resultan en 100,000 a 200,000 muertes. Por otra parte, la gastroenteritis por *Salmonella* es la infección más común a nivel mundial, con un estimado de 93.8 millones de casos que resultan en 155,000 muertes al año (Eng *et al.*, 2015).

4.2. Mecanismo de patogénesis de *Salmonella*

La infección por *Salmonella* generalmente comienza por la ingestión de agua o alimentos contaminados. *Salmonella* debe contender con diferentes

condiciones adversas a lo largo del tracto digestivo, las cuales sirven como una barrera protectora contra infecciones bacterianas. El pH ácido del estómago puede destruir a la mayoría de los microorganismos. Sin embargo, *Salmonella* responde a través de la activación de una respuesta de tolerancia al ácido, un sistema adaptativo complejo que permite la sobrevivencia de la bacteria en el estómago (Portillo *et al.*, 1993). Para que *Salmonella* pueda llegar al epitelio intestinal requiere ser móvil, para lo cual en esta fase de la infección, la bacteria cuenta con flagelos funcionales (Stecher *et al.*, 2004). Después de ingresar al intestino delgado, *Salmonella* atraviesa la capa de la mucosa intestinal y evade la acción de enzimas digestivas, sales biliares, IgA secretora, péptidos antimicrobianos y otras formas de defensa del sistema inmune innato para poder ganar acceso al epitelio subyacente (Haraga *et al.*, 2008). Una vez en la porción distal del intestino delgado, *Salmonella* tiene la capacidad de invadir a las células epiteliales. En un primer paso, las adhesinas y fimbrias son necesarias para que *Salmonella* se adhiera a estas células. Posteriormente, *Salmonella* puede invadir las células del epitelio intestinal a través de 3 diferentes rutas: (i) por la inducción de un proceso de endocitosis en los enterocitos, (ii) a través de las células M, las cuales son células epiteliales especializadas que recubren las placas de Peyer, y (iii) a través de las células dendríticas que se intercalan entre las células epiteliales extendiendo sus protusiones dentro del lumen intestinal. La invasión de las células M es la ruta predominante para atravesar la barrera intestinal. Una vez que se produce la interacción con las células hospederas intestinales, *Salmonella* les provoca una reorganización del citoesqueleto de actina, induciendo cambios morfológicos en su superficie semejantes a proyecciones, denominadas “ruffling”, las cuales facilitan la internalización de la bacteria. Tras esa internalización, las bacterias pueden ser engullidas por células fagocíticas, como macrófagos y neutrófilos, en cuyo interior sobreviven y se replican dentro de unas vacuolas especiales denominadas “vacuolas contenedoras de *Salmonella*” (SCV, del inglés *Salmonella*-containing vacuole), pudiendo de esta manera diseminarse y establecer una infección sistémica (Figura 1) (Fabrega and Vila, 2013; Hume *et al.*, 2017).

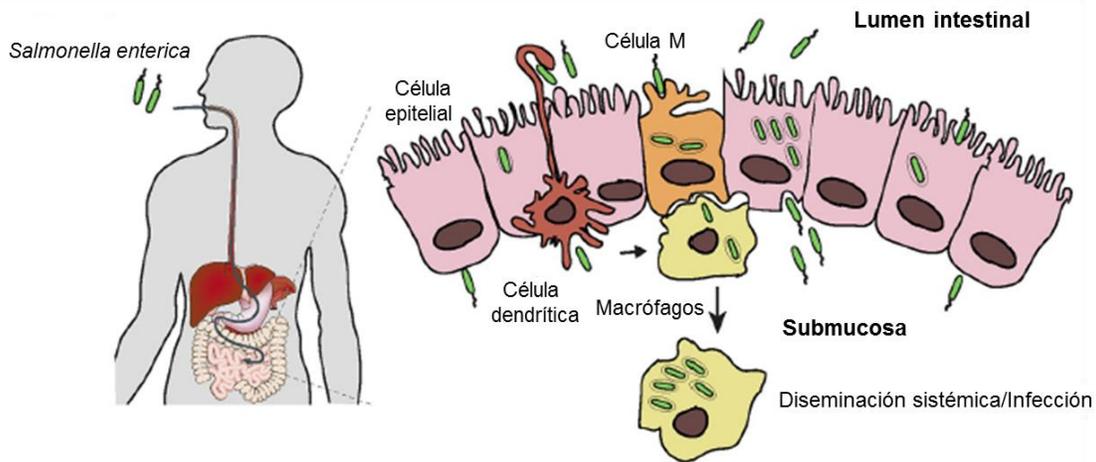


Figura 1. Mecanismo de infección de *Salmonella*. Después de su ingestión y atravesar el estómago, *Salmonella* alcanza la barrera epitelial intestinal donde puede invadir a las células M y posteriormente alcanzar a los macrófagos subyacentes. Ahí, *Salmonella* puede sobrevivir y replicarse lo suficiente como para diseminarse a nivel sistémico a través del sistema reticuloendotelial. *Salmonella* también puede invadir a células epiteliales, replicarse dentro de ellas, o ser transcitosadas y liberadas en el lado basolateral, desde donde puede infectar otras células epiteliales. Además, las células dendríticas pueden capturar directamente a *Salmonella* desde el lumen intestinal y transportarla a través del epitelio. Figura modificada de Hume *et al.*, 2017.

Dependiendo del hospedero y del serovar, la infección por *Salmonella* puede causar dos diferentes enfermedades: gastroenteritis o una enfermedad a nivel sistémico. La gastroenteritis es una infección intestinal localizada, donde la invasión de las células intestinales epiteliales genera una reacción inflamatoria en la mucosa intestinal, así la acumulación de líquido en el lumen intestinal conduce a la producción de diarrea (Santos *et al.*, 2003). En la infección sistémica, *Salmonella* atraviesa la barrera intestinal y es capaz de sobrevivir dentro de células fagocíticas, como macrófagos. *Salmonella* se disemina a través del sistema linfático alcanzando y colonizando diferentes órganos, principalmente el bazo, hígado, vesícula biliar y médula ósea, donde la bacteria puede proliferar, e incluso eventualmente causar muerte por “shock” séptico. Una fracción de individuos que sobreviven a la infección sistémica se vuelve portadores crónicos asintomáticos de *Salmonella*. En humanos, *S. Typhi* puede permanecer de forma crónica en la vesícula biliar (Bäumler *et al.*, 2011).

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) puede ocasionar una infección intestinal localizada o una infección sistémica similar a la fiebre tifoidea, dependiendo del hospedero en el que se encuentre, lo que ha

permitido su empleo para el estudio de los mecanismos moleculares por medio de los cuales *S. enterica* interactúa con las células del hospedador, utilizando modelos de infección a ratones, bovinos o a cultivos de células epiteliales (Haraga *et al.*, 2008).

4.3. Factores de virulencia de *Salmonella*

La interacción entre *Salmonella* y su hospedero requiere de una serie de elementos que le permiten a esta bacteria invadir a sus células hospederas y evadir distintos mecanismo de defensa, para así colonizar exitosamente y sobrevivir en una variedad de nichos dentro de su hospedero. A estos elementos se les conocen como factores de virulencia, los cuales participan en la quimiotaxis, movilidad, adhesión, invasión, replicación y sobrevivencia dentro de las células hospederas. Muchos de los genes que codifican para factores de virulencia se encuentran agrupados en regiones cromosomales denominadas islas de patogenicidad, mientras que otros se localizan como genes únicos en el cromosoma o en plásmidos (Fabrega and Vila, 2013).

4.3.1. Flagelo

El flagelo es un filamento helicoidal embebido en la membrana celular bacteriana que permite a las bacterias moverse en diferentes ambientes. La estructura general y organización del flagelo está altamente conservada entre las bacterias Gram-negativas. Este organelo es un complejo supramolecular formado por un cuerpo basal embebido en la superficie membranal y que actúa como un motor rotatorio, que a su vez se une al filamento helicoidal a través de un gancho. Este filamento es el que tiene la función de hélice o propela, que impulsa a la bacteria en la dirección requerida (Macnab, 2003). La mayoría de los serovares de *Salmonella* poseen hasta 10 flagelos en su superficie celular (Asten and Dijk, 2005). Estos flagelos le permiten a *Salmonella* alcanzar el nicho a invadir, por lo que la función flagelar es importante durante la etapa temprana de la infección por esta bacteria (Fabrega and Vila, 2013).

4.3.2. Adhesinas

La interacción entre *Salmonella* y su célula hospedera es un requisito para la colonización. Este proceso está principalmente mediado por adhesinas que se encuentran en la superficie de la bacteria. Las adhesinas son responsables del reconocimiento y de la unión a receptores específicos de la célula hospedera. *S. enterica* cuenta con diferentes sistemas de adhesión que pueden ser divididos en dos categorías, adhesinas fimbriales (fimbrias o pilis) y adhesinas no fimbriales. (Wagner and Hensel, 2011). Las fimbrias son estructuras filamentosas de superficie que promueven la adhesión entre la bacteria y superficies bióticas y abióticas, por lo que además de permitir la adherencia de *Salmonella* a sus células hospederas también participan en la formación de biopelículas. Cada operón fimbrial contiene típicamente entre 8 y 11 genes. Se han identificado varios operones fimbriales en *Salmonella*, entre los que se encuentran aquellos que codifican para las fimbrias tipo I, las curli, las Pef y las Std.

Las adhesinas no fimbriales comprenden un grupo heterogéneo de proteínas que pueden ser secretadas a través del sistema de secreción tipo I, como las adhesinas SiiE y BapA, o pueden ser autotransportadas a través de la membrana bacteriana, como las adhesinas ShdA, MisL y SadA (Wagner and Hensel, 2011; Fabrega and Vila, 2013).

4.3.3. Sistema de secreción tipo III

La secreción de proteínas de virulencia, llamadas efectores, dentro de las células hospederas, es un paso crucial para la virulencia de las bacterias y su patogénesis. El sistema de secreción tipo III (SST3) es una maquinaria molecular altamente conservada codificada por muchas bacterias patógenas Gram-negativas o simbióticas que interaccionan con animales, plantas o insectos. Muchas bacterias Gram-negativas usan SST3s para liberar moléculas o complejos efectores directamente dentro del citoplasma de sus células hospederas. Estos sistemas están evolutivamente relacionados con el flagelo, pues muchas de las proteínas que lo conforman presentan homología con las proteínas del aparato de exportación flagelar. Los SST3 están compuestos por alrededor de 20 proteínas que forman el aparato de secreción, el cual está compuesto de un cuerpo basal anclado a la membrana bacteriana y una aguja externa, a través de la cual son secretadas las proteínas efectoras. Aunque los componentes de los aparatos de

los SST3 están relativamente conservados, cada patógeno libera un repertorio único de efectores dentro de las células hospederas (Galán *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2015).

Salmonella cuenta con dos diferentes SST3 codificados en distintas regiones del cromosoma, conocidas como islas de patogenicidad de *Salmonella* 1 y 2 (SPI-1 y SPI-2, respectivamente). Cada SST3 ejerce su función en diferente momento durante el proceso de infección. Por un lado, el SST3 codificado en SPI-1 (SST3-1) es requerido para iniciar la infección intestinal, al translocar efectores que promueven la invasión de *Salmonella* a células epiteliales del intestino. Por otro lado, el SST3 codificado en SPI-2 (SST3-2) permite el establecimiento de la infección sistémica, al ser requerido principalmente para la replicación de *Salmonella* dentro de las SCV de células de varios órganos del hospedero (Haraga *et al.*, 2008; Moest and Méresse, 2013).

4.4. Islas de patogenicidad de *Salmonella*

En muchos patógenos, los genes de virulencia se encuentran agrupados formando islas de patogenicidad que fueron adquiridas por diferentes eventos de transferencia horizontal. Estas islas por lo general tienen un contenido de G+C distinto del resto del genoma y tienen secuencias en los extremos que presentan homología con elementos de inserción, transposones y profágos, lo que sugiere un posible mecanismo de adquisición (Groisman and Ochman, 1996). La mayoría de los genes necesarios para la virulencia de *Salmonella* están localizados en regiones particulares del genoma conocidas como islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs, por “*Salmonella* Pathogenicity Islands”) (Marcus *et al.*, 2000; Schmidt and Hensel, 2004). Hasta el momento se han reportado 22 SPIs (Desai *et al.*, 2013), siendo SPI-1 y SPI-2 las más estudiadas y mayormente caracterizadas debido a su papel en virulencia. SPI-1 y SPI-2 codifican para factores de virulencia necesarios para la invasión a las células hospederas y para la replicación intracelular, respectivamente (Hansen-Wester and Hensel, 2001).

4.4.1. SPI-1

SPI-1 abarca una región de aproximadamente 40 kb que se encuentra en todos los miembros del género *Salmonella* (Hensel, 2004). Esta isla contiene 39 genes, los cuales codifican para un SST3, proteínas efectoras, sus chaperonas y

varios reguladores transcripcionales (*SprB*, *HilC*, *HilD*, *HilA* e *InvF*). Contiene tres operones multicistrónicos (*prg/org*, *sic/sip* e *inv/spa*) y varias unidades monocistrónicas (*avrA*, *sprB*, *hilC*, *hilD*, *hilA*, *iagB*, *sptP* e *invH*) (Altier, 2005). Los operones *prg/org* e *inv/spa* codifican para el complejo-aguja del SST3-1, mientras que en el operón *sic/sip* se encuentran codificadas las proteínas efectoras *AvrA*, *SipA* y *SptP*, así como las translocadoras *SipB*, *SipC* y *SipD* (Figura 2). El SST3-1 y los efectores translocados a través de este sistema, promueven la reorganización de las proteínas del citoesqueleto de la membrana de las células epiteliales del lumen intestinal, facilitando con ello la internalización de *Salmonella* (Fabrega and Vila, 2013).

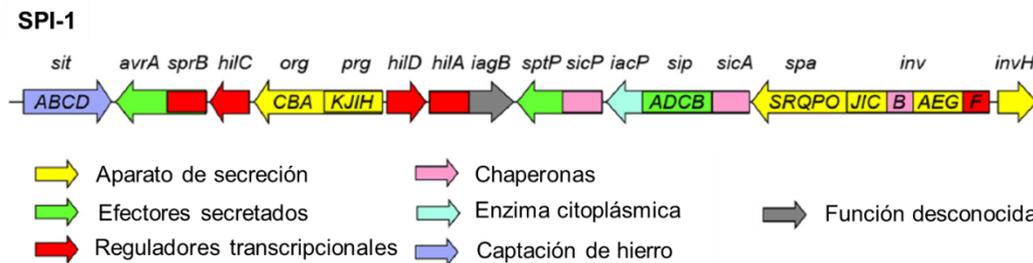


Figura 2. Organización genética de SPI-1. Se indica el orden y la nomenclatura de los genes codificados en esta isla. Figura modificada de Fabrega and Vila, 2013.

De acuerdo a su función, los genes de SPI-1 se expresan cuando *Salmonella* está en el lumen intestinal o en el citosol de células epiteliales (Knodler *et al.*, 2010; Laughlin *et al.*, 2014). Entre las principales condiciones ambientales que favorecen la expresión de los genes de SPI-1 se encuentran la alta osmolaridad, el pH ligeramente alcalino, bajas concentraciones de oxígeno, determinadas concentraciones de ciertos ácidos grasos y bilis (Lawhon *et al.*, 2002; Altier, 2005; Jones, 2005; Hung *et al.*, 2013; Golubeva *et al.*, 2016; Eade *et al.*, 2016). En condiciones de laboratorio, los genes de SPI-1 se expresan cuando *Salmonella* crece en un medio rico en nutrientes, como es el medio LB (Lundberg *et al.*, 1999), debido, entre otros factores, a la alta osmolaridad que presenta este medio (Altier, 2005).

La expresión de los genes de SPI-1 se induce mediante una cascada de regulación conformada principalmente por los reguladores *HilD*, *HilA* e *InvF*, todos codificados en SPI-1; sin embargo, otros reguladores también han sido

involucrados en el control de la expresión de los genes de esta isla (Golubeva *et al.*, 2012). En la Figura 3 se muestra a los reguladores involucrados en la regulación de la expresión de los genes de SPI-1.

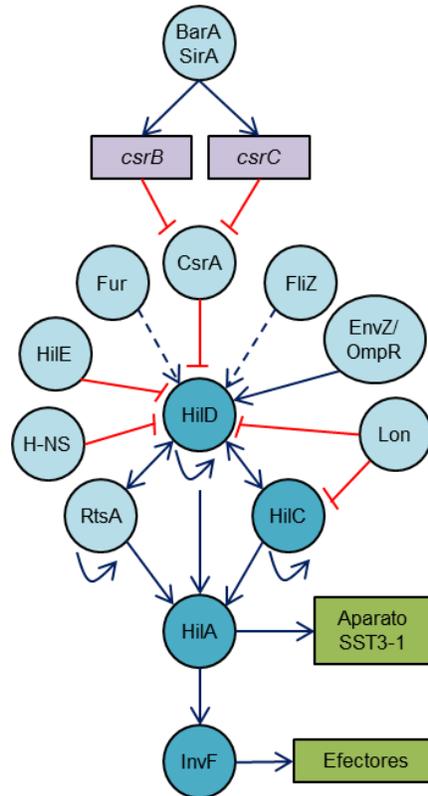


Figura 3. Regulación de la expresión de los genes de SPI-1. Se muestra la red de regulación para la expresión de los genes de SPI-1. En azul oscuro se indican los reguladores codificados dentro de SPI-1 y en azul claro los reguladores codificados fuera de esta isla. Las flechas continuas indican una regulación positiva, mientras que las flechas truncadas indican una regulación negativa. Las flechas azules punteadas indican que se desconoce el mecanismo de regulación positiva.

HilD es un regulador que pertenece a la familia AraC/XylS, y regula positivamente la expresión de *hilA*, de manera directa o a través de un circuito de regulación que conforma con HilC y RtsA (también miembros de la familia AraC/XylS). Cada uno de estos reguladores es capaz de inducir independientemente la expresión de *hilD*, *hilC* y *rtsA*, así como de *hilA* (Ellermeier *et al.*, 2005). HilD, HilC y RtsA se unen a las regiones promotoras de *hilD*, *hilC*, *rtsA* y *hilA*, contrarrestando el silenciamiento por H-NS (Olekhovich and Kadner, 2002; Schechter *et al.*, 2003; Olekhovich and Kadner, 2007). En este circuito HilD

es el regulador dominante en el sistema, mientras que HilC y RtsA amplifican la señal (Ellermeier *et al.*, 2005). A su vez, HilA, miembro de la familia de reguladores transcripcionales OmpR/ToxR, activa directamente la expresión de los operones *prg/org* e *inv/spa*. De esta forma, se induce la expresión del regulador InvF, miembro de la familia de AraC/XylS. Este regulador induce en cascada la expresión del operón *sic/sip*, lo que conlleva a la expresión del resto de los genes de SPI-1 (Figura 3) (Altier, 2005).

H-NS pertenece al grupo de proteínas asociadas al nucleóide (NAPs), las cuales afectan el superenrollamiento del DNA, lo que las hace capaces de regular la expresión genética (Dillon and Dorman, 2010). H-NS reprime la expresión de *hilA*, *hilD*, *hilC* y *rtsA* (Olekhovich and Kadner, 2006; Olekhovich and Kadner, 2007). Se ha reportado que dentro de la SCV, el sistema de dos componentes PhoP/PhoQ puede regular negativamente a *hilA*, reprimiendo así la expresión de los genes de SPI-1 (Pegues *et al.*, 1995; Bajaj *et al.*, 1996). Por otro lado, el sistema de dos componentes SirA/BarA induce la expresión de los genes de SPI-1 al activar la expresión de CsrB y CsrC, dos moléculas de RNA pequeños no codificantes, que secuestran a la proteína de unión a RNA, CsrA (Martínez *et al.*, 2011). CsrA regula postranscripcionalmente la expresión de *hilD*, uniéndose a la secuencia Shine-Dalgarno del RNAm de *hilD*, evitando así su traducción (Martínez *et al.*, 2011). Otro sistema de dos componentes que participa en la regulación de los genes de SPI-1 es OmpR/EnvZ, el cual se ha propuesto que regula positivamente a HilD postranscripcionalmente (Fabrega and Vila, 2013). HilE reprime la expresión de los genes de SPI-1 cuando se une directamente a HilD, inactivando a este regulador (Baxter *et al.*, 2003). En contraste, el regulador flagelar FliZ regula positivamente la expresión de HilA, lo que activa la expresión de los genes de SPI-1 (Altier, 2005; Ellermeier and Slauch, 2007; Fabrega and Vila, 2013). También se ha reportado que el regulador Fur activa la expresión de los genes de SPI-1 actuando a través de un mecanismo desconocido sobre HilD (Ellermeier and Slauch, 2008). Asimismo, la proteasa Lon regula negativamente a SPI-1 al degradar a HilD y HilC (Takaya *et al.*, 2004; Matsui *et al.*, 2008).

4.4.1.1. HilD

Como se mencionó anteriormente, HilD pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS. HilD tiene un dominio de unión a DNA que posee dos motivos de hélice-vuelta-hélice (HTH). Es una proteína que es

capaz de dimerizar y de esta forma unirse a sus genes blanco (Grenz *et al.*, 2018; Paredes-Amaya *et al.*, 2018). Además de regular la expresión de los genes de SPI-1, HilD controla la expresión de los genes de SPI-2 (Bustamante *et al.*, 2008). Asimismo, HilD regula directamente la expresión de otros genes adquiridos y ancestrales localizados fuera de SPI-1 y SPI-2, como *rtsA*, *siiA*, *sinR*, *flhDC*, *phoH*, entre otros (Petrone *et al.*, 2014; Singer *et al.*, 2014; Colgan *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2016; Martínez-Flores *et al.*, 2016). Esto indica que HilD activa la expresión de genes adquiridos durante la evolución de *Salmonella*, así como la expresión de genes pre-existentes a la adquisición de HilD.

4.4.1.2. SprB

El regulador transcripcional SprB, codificado en SPI-1, pertenece a la familia de reguladores LuxR/UhpA y contiene un dominio de unión a DNA HTH en el extremo carboxilo terminal. SprB no regula la expresión de genes de SPI-1 (Eichelberg *et al.*, 1999; Saini and Rao, 2010) pero se ha reportado que activa directamente la expresión de los genes de SPI-4 y que su expresión es controlada por HilA (Saini and Rao, 2010). SPI-4 está formado por un operón que contiene 6 genes (*siiABCDEF*), donde *siiE* codifica para una adhesina no fimbrial (Gerlach *et al.*, 2007). Recientemente, mediante un análisis de ChIP-Seq, se encontraron nuevos genes regulados por SprB, entre los que se encuentran algunos genes asociados a virulencia y varios genes hipotéticos (Smith *et al.*, 2016).

4.4.2. SPI-2

SPI-2 abarca una región de aproximadamente 40 kb que contiene 44 genes y se ha dividido en dos segmentos (Hensel *et al.*, 1999). Esta isla está presente únicamente en *S. enterica* y contiene los genes que codifican para el SST3-2, proteínas efectoras, sus chaperonas, así como para el sistema de dos componentes SsrA/SsrB (Hensel, 2004). Todos estos genes se localizan en tres operones multicistronicos (*ssa1*, *ssa2* y *sse*) y en un operón bicistrico (*ssrAB*) (Figura 4) (Fass and Groisman, 2009). En general, esta isla le permite a *Salmonella* sobrevivir y replicarse dentro de las células hospederas (células epiteliales y macrófagos) debido a las diferentes funciones de sus proteínas efectoras, por lo que es requerida para el establecimiento de la infección sistémica (Haraga *et al.*, 2008).

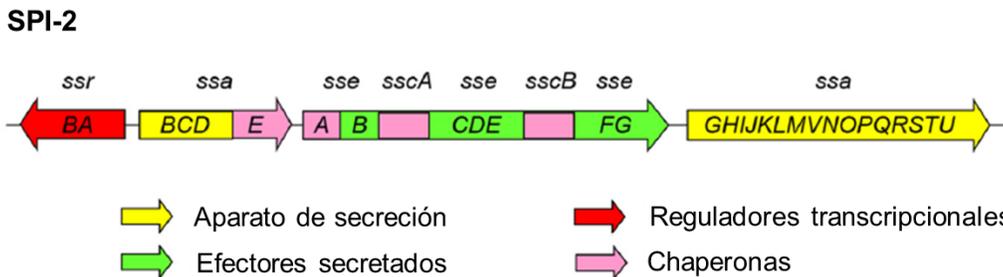


Figura 4. Organización genética de SPI-2. Se indica el orden y la nomenclatura de los genes codificados en esta isla. Figura modificada de Fabrega and Vila, 2013.

Los genes de SPI-2 se expresan cuando *Salmonella* se encuentra dentro de las SCV de sus células hospederas, como macrófagos y células epiteliales (Cirillo *et al.*, 1998; Eriksson *et al.*, 2003; Knodler *et al.*, 2010). Entre las señales que se han definido que inducen la expresión de los genes de SPI-2 se encuentran la limitación de fosfato inorgánico o Mg^{2+} y el pH ácido, condiciones que puede encontrar *Salmonella* cuando está en las SCV de las células hospederas (Löber *et al.*, 2006). Por lo tanto, en condiciones de laboratorio, los genes de SPI-2 se expresan cuando *Salmonella* crece en medios mínimos que contienen concentraciones bajas de fosfato y magnesio (Deiwick *et al.*, 1999). También se ha reportado que los genes de SPI-2 se expresan cuando *Salmonella* crece en un medio rico en nutrientes, como es el medio LB en una fase de crecimiento estacionaria tardía (Bustamante *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2014).

El sistema de dos componentes SsrA/SsrB, formado por la proteína sensora histidina cinasa SsrA y el regulador de respuesta SsrB, induce la expresión de los genes de SPI-2 (Fass and Groisman, 2009). Se ha reportado que H-NS reprime la expresión de los genes de SPI-2 al unirse directamente a varios promotores de esta isla. La represión de H-NS sobre el operón *ssrAB* puede ser contrarrestada por HilD y SlyA bajo ciertas condiciones, como en la fase estacionaria de crecimiento en medio LB (Bustamante *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2014; Banda *et al.*, 2019), mientras que SsrB contrarresta la represión de H-NS sobre los demás genes de SPI-2 (Walthers *et al.*, 2007; Fass and Groisman, 2009). Se ha reportado que otras dos NAPs, Hha y YdgT, también reprimen la transcripción de los genes de SPI-2 (Fabrega and Vila, 2013). Por otro lado, cuando *Salmonella* crece en medios mínimos, la expresión de SsrA/B, y por lo tanto de los genes de SPI-2, depende de los reguladores SlyA, OmpR/EnvZ y

PhoP/PhoQ (Lee *et al.*, 2000; Bijlsma and Groisman, 2005; Fass and Groisman, 2009). PhoP controla positivamente de forma postranscripcional los niveles de SsrA (Bijlsma and Groisman, 2005). Por su parte, OmpR se une directamente al promotor *ssrAB*, activando así la transcripción de estos genes, tanto en medio rico como en medio mínimo. Fis se une a los promotores de los operones *ssr* y *ssa* activando así la transcripción de estos genes (Fass and Groisman, 2009). SlyA también puede actuar como anti-represor de H-NS en medio mínimo, y así inducir la expresión del operón *ssrAB* (Linehan *et al.*, 2005; Banda *et al.*, 2019). En la Figura 5 se muestra a los reguladores involucrados en la regulación de la expresión de los genes de SPI-2.

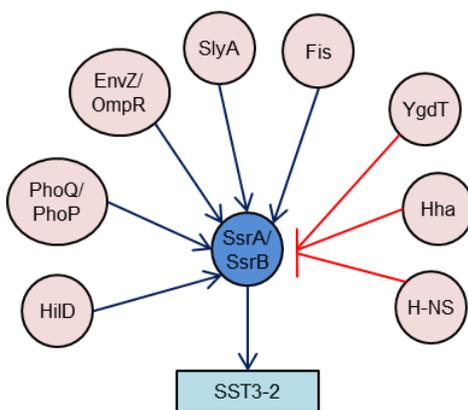


Figura 5. Regulación de la expresión de los genes de SPI-2. Se muestra la red de regulación para la expresión de los genes de SPI-2. En azul oscuro se indica al sistema de dos componentes SsrA/B, codificado en SPI-2, el cual controla positivamente la expresión de los genes de esta isla. En rosa claro se muestran los reguladores codificados fuera de SPI-2 que controlan la expresión del operón *ssrAB*, y que de esta manera regulan a los genes de esta isla. Las flechas continuas indican una regulación positiva, mientras que las flechas truncadas indican una regulación negativa.

4.5. Sistema de dos componentes PhoQ/PhoP

El sistema de dos componentes PhoP/PhoQ, formado por la proteína sensora histidina cinasa PhoQ y el regulador de respuesta PhoP, se encuentra en *S. enterica*, así como en otras bacterias Gram-negativas (Groisman, 2001). En *Salmonella*, PhoQ responde a concentraciones bajas de Mg^{2+} , pH ácido, y la presencia de ciertos péptidos antimicrobianos en el periplasma bacteriano, lo que conlleva a que PhoQ se autofosforile en un residuo de histidina y posteriormente

transfiera el grupo fosfato a un residuo de aspartato del regulador de respuesta PhoP, promoviendo así el estado fosforilado de PhoP (PhoP-P). PhoP-P es la forma activa de la proteína PhoP, y es la que es capaz de unirse a los promotores de sus genes blanco, activando o reprimiendo la expresión de los mismos (Groisman, 2001; Prost and Miller, 2008). PhoP controla la expresión de alrededor del 9% de los genes en *Salmonella* (Colgan *et al.*, 2016). Además de los genes de SPI-2, PhoP/PhoQ regula la expresión de SPI-1, reprimiendo la expresión de *hilA* (Golubeva *et al.*, 2012). Asimismo, el sistema PhoP/PhoQ regula genes que son importantes para la homeostasis del Mg^{2+} , así como para la modificación de los lipopolisacáridos, lo cual determina la susceptibilidad de la bacteria a péptidos antimicrobianos catiónicos (Soncini *et al.*, 1996; Groisman, 1998; Ernst *et al.*, 2001).

5. ANTECEDENTES

En estudios previos de análisis de transcriptomas, se encontró que HilD regula a varios genes adicionales a los ya reportados (Colgan *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2016), incluyendo los genes *SL1872* y *SL1770*, reportados como genes hipotéticos. Asimismo, en nuestro grupo se demostró que los genes *SL1872* y *SL1770* se co-expresan con los genes de SPI-1 (Martínez-Flores *et al.*, 2016). Por medio de herramientas bioinformáticas, se determinó que ambos genes tienen un promotor dependiente del factor sigma 70 y se encuentran como unidades monocistrónicas en el genoma de *Salmonella* (Kröger *et al.*, 2013).

Previo a este proyecto, en nuestro grupo se confirmó que HilD regula de manera positiva la expresión de los genes *SL1872* y *SL1770* en medio LB. Adicionalmente, se determinó que ambos genes se expresan de manera independiente de HilD en medio mínimo N (MM-N), a un nivel similar o mayor que su expresión en LB (Manzo-Durán, R., 2015, Tesis de Maestría) (Figura 6). Estos resultados indican que los genes *SL1872* y *SL1770* se pueden expresar por dos mecanismos diferentes, uno dependiente y el otro independiente de HilD, en respuesta al crecimiento en LB y en MM-N, respectivamente. Debido a que HilD regula positivamente ambos genes, se les ha denominado *grhD1* y *grhD2* a *SL1872* y *SL1770*, respectivamente, en referencia a: 'gen regulado por HilD'.

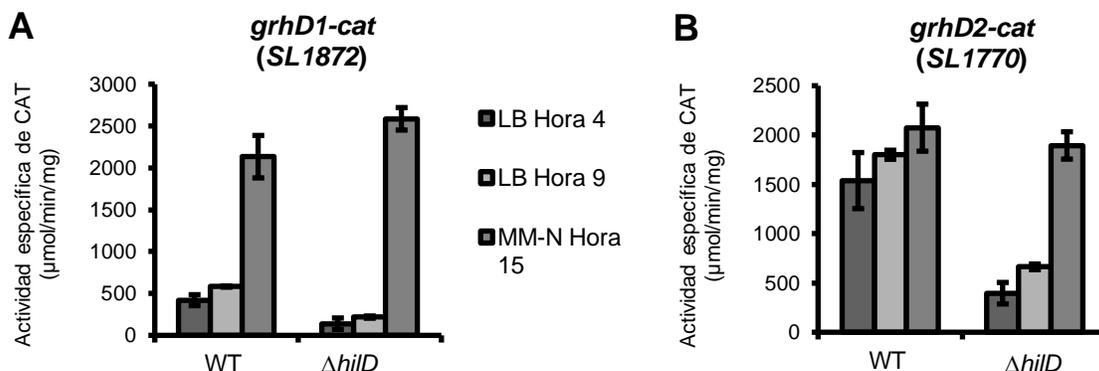


Figura 6. Los genes *grhD1* y *grhD2* se expresan por dos diferentes mecanismos, uno dependiente y el otro independiente de HilD. La expresión de las fusiones transcripcionales *grhD1-cat* (A) y *grhD2-cat* (B), contenidas en los plásmidos pgrhD1-cat y pgrhD2-cat, respectivamente, fue evaluada en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y su cepa isogénica Δ*hilD*. La actividad específica de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT) fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 4 y 9 h en LB y 15 h en medio mínimo N (MM-N) a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes

realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Figura tomada de Manzo-Durán, R., 2015, Tesis de Maestría.

La proteína GrhD1 tiene un peso molecular de 11.769 kDa y no se puede predecir por métodos bioinformáticos algún dominio funcional. La proteína GrhD2 tiene un peso molecular de 8.439 kDa y por medio de programas bioinformáticos se ha logrado predecir un dominio compartido con proteínas de la familia YobH, que abarca del aminoácido 2 al 71, así como un dominio transmembranal, del aminoácido 7 al 29. La proteína YobH es el ortólogo de GrhD2 en *E. coli* y su función aún no ha sido caracterizada. YobH tiene un 73% de identidad con GrhD2, además, ambas proteínas conservan el mismo contexto genómico. En YobH también se predice el mismo dominio transmembranal que para GrhD2.

Previamente se reportó que el gen *grhD1* forma parte de una isla genómica adquirida que está flanqueada por el gen *yecA* de función desconocida y el gen *leuZ* que codifica para un tRNA. Esta isla contiene dos genes adicionales, *SL1873* (*ecgA*) y *SL1874*, y el pseudogen *SL1874A*. Se determinó que esta isla genómica no se encuentra en otras bacterias, como *E. coli* K-12, por lo que se encuentra exclusivamente en *Salmonella*, incluyendo a *S. bongori* (Figura 7). El gen *SL1873* codifica para una L-endopeptidasa (EcgA), la cual se requiere para la modificación del peptidoglicano de la pared celular. La ausencia de *SL1873* reduce la virulencia de *S. Typhimurium* en el modelo de infección sistémica en ratones. *SL1874* codifica para una proteína hipotética de membrana. Interesantemente, el regulador de respuesta PhoP regula de manera positiva la expresión de los genes *SL1873* y *SL1874*, uniéndose a una región corriente arriba del promotor de *SL1874* (Rico-Pérez *et al.*, 2016).

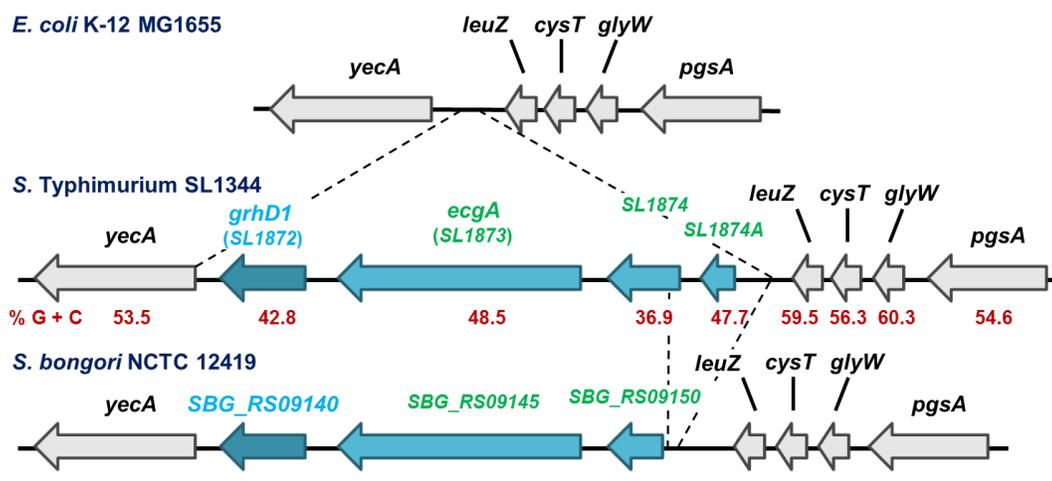


Figura 7. Contexto genómico del gen *grhD1* en *Salmonella*. El gen *grhD1* está conservado en *S. enterica* y *S. bongori*, y está ausente en *E. coli*. Los otros genes que forman parte de la misma isla genómica (*ecgA* y *SL1874*) presentan la misma distribución filogenética que *grhD1*. El pseudogen *SL1874A* está ausente en *S. bongori*. Se muestran las regiones del genoma de *E. coli* K-12 MG1655, *S. enterica* serovar Typhimurium SL1344 y *S. bongori* NCTC 12419. Se indica el contenido de G + C para cada gen de *S. Typhimurium* SL1344. Figura modificada de Rico-Pérez *et al.*, 2016.

Contrariamente, el gen *grhD2* no se encuentra en una isla genómica, y está flanqueado por el gen *yobG* que codifica para una proteína hipotética de membrana y el gen *kdgR* que codifica para un regulador transcripcional de genes involucrados en el metabolismo de 2-ceto-3-desoxigluconato (KDG) (Figura 8). Ortólogos de este gen, se han podido localizar en *S. bongori* y en otras enterobacterias como *E. coli* y *Citrobacter koseri*.

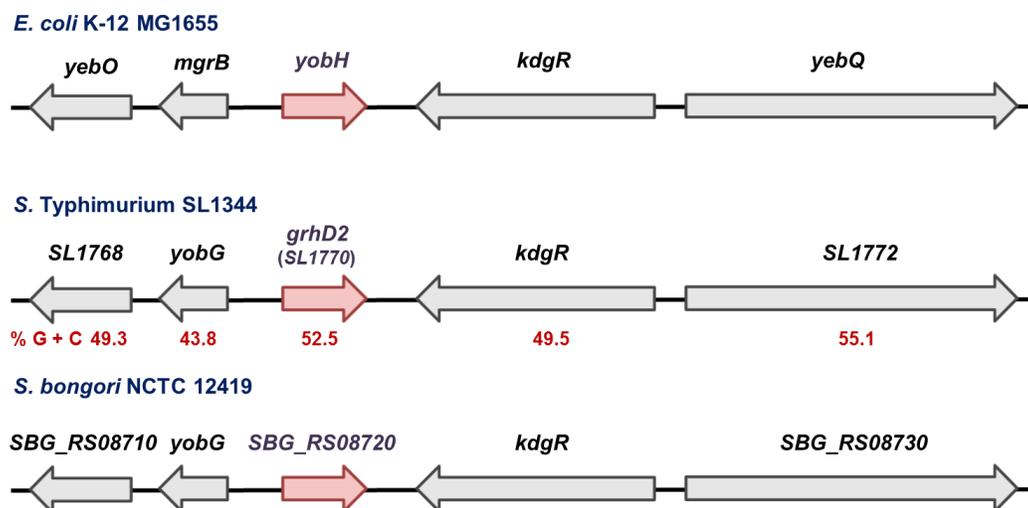


Figura 8. Contexto genómico del gen *grhD2* en *S. Typhimurium* y de sus ortólogos en *S. bongori* y *E. coli*. El gen *grhD2* está conservado en *S. enterica* y *S. bongori*, así como en otras enterobacterias, como *E. coli*. Los genes que flanquean a *grhD2* presentan la misma distribución filogenética. Se muestran las regiones del genoma de *E. coli* K-12 MG1655, *S. enterica* serovar Typhimurium SL1344 y *S. bongori* NCTC 12419. Se indica el contenido de G + C para cada gen de *S. Typhimurium* SL1344.

La expresión dependiente de HiiD de los genes *grhD1* y *grhD2* en LB podría sugerir que estos genes son importantes para la invasión de *Salmonella* a células epiteliales y por lo tanto para la infección intestinal. Asimismo, su expresión en medio mínimo podría sugerir que estos genes son importantes para la replicación

intracelular de *Salmonella* y por lo tanto para la infección sistémica. En apoyo a esto último, en un estudio previo de análisis de transcriptomas, mediante microarreglos, se encontró que los genes *grhD1* y *grhD2* se expresan dentro de macrófagos (Eriksson *et al.*, 2003). En otro estudio de transcriptomas mediante RNAseq, se encontró que la expresión de *grhD1* se incrementa dentro de macrófagos, mientras que la de *grhD2* disminuye (Srikumar *et al.*, 2015).

Con base en estos antecedentes, en este proyecto nos planteamos definir el papel en virulencia del producto de los genes *grhD1* y *grhD2*, así como determinar los mecanismos que controlan su expresión, tanto de manera dependiente como independiente de HilD.

6. HIPÓTESIS

Las proteínas codificadas por los genes *grhD1* y *grhD2* son importantes para que *S. Typhimurium* pueda establecer una infección intestinal y/o sistémica en función de condiciones de crecimiento que simulan distintos nichos que encuentra esta bacteria en sus hospederos; su expresión se controla por HilD y otros reguladores de genes de virulencia.

7. OBJETIVOS

-Objetivo General.

Definir el papel que los genes *grhD1* y *grhD2* juegan en la virulencia e identificar a los reguladores involucrados en su expresión.

-Objetivos Específicos.

1. Determinar las vías que permiten inducir la expresión de estos genes de manera dependiente e independiente de HilD.
2. Evaluar el efecto de la inactivación de estos genes sobre la invasión y replicación en células epiteliales y macrófagos en cultivo.
3. Determinar el papel en virulencia de estos genes en el modelo del ratón tanto para la infección sistémica como para la infección intestinal.
4. Determinar la importancia de estos genes en la patogénesis de *Salmonella*.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

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

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas

Cepa	Descripción	Referencia
<u>S. Typhimurium:</u>		
SL1344	Cepa silvestre SL1344, Stp ^R	(Hoiseh and Stocker, 1981)
ΔSPI-1::km	Derivada de SL1344; ΔSPI-1::km, Stp ^R , Km ^R	(Drecktrah <i>et al.</i> , 2006)
DTM97	Derivada de SL1344; Δ <i>ssrB</i> ::km, Stp ^R , Km ^R	(Pérez-Morales <i>et al.</i> , 2017)
VV341	Derivada de SL1344; Δ <i>hilA</i> ::km, Stp ^R , Km ^R	(Bajaj <i>et al.</i> , 1996)
JPTM4	Derivada de SL1344; Δ <i>invF</i> ::km, Stp ^R , Km ^R	(Bustamante <i>et al.</i> , 2008)
JPTM5	Derivada de SL1344; Δ <i>hilD</i> ::km, Stp ^R , Km ^R	(Bustamante <i>et al.</i> , 2008)
JPTM25	Derivada de Δ <i>hilD</i> ::km; Δ <i>hilD</i> , Stp ^R	(Martínez <i>et al.</i> , 2011)
JPTM6	Derivada de SL1344; Δ <i>hilC</i> ::km, Stp ^R , Km ^R	(Bustamante <i>et al.</i> , 2008)
DTM91	Derivada de SL1344; Δ <i>rtsA</i> ::km, Stp ^R , Km ^R	(Pérez-Morales <i>et al.</i> , 2017)
DTM90	Derivada de SL1344; Δ <i>flhDC</i> ::km, Str ^R , Km ^R	(Martínez-Flores <i>et al.</i> , 2016)
DTM94	Derivada de Δ <i>rtsA</i> ΔSPI-1::km; Δ <i>rtsA</i> ΔSPI-1, Stp ^R	(Pérez-Morales <i>et al.</i> , 2017)
DTM123	Derivada de SL1344; Δ <i>sinR</i> ::km, Stp ^R , Km ^R	(Pérez-Morales D., no publicado)
DTM115	Derivada de Δ <i>slyA</i> ::km; Δ <i>slyA</i> , Str ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2019)
JPTM3	Derivada de Δ <i>ompR</i> ::km; Δ <i>ompR</i> , Str ^R	(Bustamante <i>et al.</i> , 2008)
DTM103	Derivada de SL1344; Δ <i>phoP</i> ::km, Stp ^R , Km ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
DTM104	Derivada de Δ <i>phoP</i> ::km; Δ <i>phoP</i> , Stp ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
DTM105	Derivada de Δ <i>phoP</i> ; Δ <i>phoP</i> Δ <i>hilD</i> ::km, Str ^R , Km ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
DTM106	Derivada de Δ <i>phoP</i> Δ <i>hilD</i> ::km; Δ <i>phoP</i> Δ <i>hilD</i> , Stp ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
DTM121	Derivada de SL1344; Δ <i>sprB</i> ::km, Stp ^R , Km ^R	Este trabajo
DTM122	Derivada de Δ <i>sprB</i> ::km; Δ <i>sprB</i> , Stp ^R	Este trabajo
Δ <i>invC</i> ::km	Derivada de SL1344; Δ <i>invC</i> ::km, Stp ^R , Km ^R	Este trabajo
Δ <i>invC</i>	Derivada de Δ <i>invC</i> ::km; Δ <i>invC</i> , Stp ^R	Este trabajo

$\Delta ssaV::km$	Derivada de SL1344; $\Delta ssaV::km$, Stp ^R , Km ^R	Este trabajo
$\Delta ssaV$	Derivada de $\Delta ssaV::km$; $\Delta ssaV$, Stp ^R	Este trabajo
$\Delta siiE::km$	Derivada de SL1344; $\Delta siiE::km$, Stp ^R , Km ^R	Este trabajo
DTM101	Derivada de SL1344; $\Delta grhD1::km$, Stp ^R , Km ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
DTM102	Derivada de $\Delta grhD1::km$; $\Delta grhD1$, Stp ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
DTM114	Derivada de $\Delta grhD1$; $\Delta grhD1 + grhD1::3XFLAG-km$, Stp ^R , Km ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
DTM124	Derivada de SL1344; $\Delta grhD2::km$, Stp ^R , Km ^R	(Manzo-Durán R., no publicado)
DTM125	Derivada de $\Delta grhD2::km$; $\Delta grhD2$, Stp ^R	Este trabajo
DTM126	Derivada de $\Delta grhD2$; $\Delta grhD2 + grhD2::3XFLAG-km$, Stp ^R , Km ^R	Este trabajo
$\Delta grhD2 + grhD2::3XFLAG$	Derivada de $\Delta grhD2 + grhD2::3XFLAG-km$; $\Delta grhD2 + grhD2::3XFLAG$, Stp ^R	Este trabajo
$\Delta invC \Delta ssrB::km$	Derivada de $\Delta invC$; $\Delta invC \Delta ssrB::km$, Stp ^R , Km ^R	Este trabajo
$\Delta invC \Delta siiE::km$	Derivada de $\Delta invC$; $\Delta invC \Delta siiE::km$, Stp ^R , Km ^R	Este trabajo
$\Delta invC \Delta grhD2::km$	Derivada de $\Delta invC$; $\Delta invC \Delta grhD2::km$, Stp ^R , Km ^R	Este trabajo
$\Delta invC::km \Delta grhD2 + grhD2::3XFLAG$	Derivada de $\Delta grhD2 + grhD2::3XFLAG$; $\Delta invC::km \Delta grhD2 + grhD2::3XFLAG$, Stp ^R , Km ^R	Este trabajo
DTM107	Derivada de SL1344; expresa la proteína GrhD1-FLAG, Str ^R , Km ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
DTM108	Derivada de $grhD1::3XFLAG-km$; expresa la proteína GrhD1-FLAG, Str ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
DTM127	Derivada de SL1344; expresa la proteína GrhD2-FLAG, Str ^R , Km ^R	(Manzo-Durán R., no publicado)
DTM128	Derivada de $grhD2::3XFLAG-km$; expresa la proteína GrhD2-FLAG, Str ^R	Este trabajo
DTM113	Derivada de SL1344; expresa la proteína AvrA-FLAG, Str ^R , Km ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
$avrA::3XFLAG$	Derivada de $avrA::3XFLAG-km$; expresa la proteína AvrA-FLAG, Str ^R	Este trabajo
<u><i>S. bongori</i>:</u>		
66:z41	Cepa silvestre 66:z41	(Osborne <i>et al.</i> , 2009)
<u><i>E. coli</i>:</u>		
DH10 β	Cepa de laboratorio, Str ^R	Invitrogen
MC4100	Cepa silvestre de laboratorio, Stp ^R	(Ferenci <i>et al.</i> , 2009)
Δhns	Derivada de MC4100; Δhns , Stp ^R	(Bustamante <i>et al.</i> , 2011)

MG1655	Cepa silvestre de laboratorio	M. Cashel
<i>yobH::3XFLAG-km</i>	Derivada de MG1655; expresa la proteína YobH-FLAG, Km ^R	Este trabajo
<i>yobH::3XFLAG</i>	Derivada de <i>yobH::3XFLAG-km</i> ; expresa la proteína YobH-FLAG	Este trabajo

Tabla 2. Plásmidos utilizados

Plásmido	Descripción *	Referencia
pKK232-8	Derivado de pBR322, contiene el gen <i>cat</i> (cloranfenicol acetil transferasa) sin promotor, empleado para la construcción de fusiones transcripcionales; Amp ^R	(Brosius, 1984)
pgrhD1-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>grhD1-cat</i> , que lleva la región -61 a +270 ^a , Amp ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
pgrhD1L-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>grhD1L-cat</i> , que lleva la región -250 a +270 ^a , Amp ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
pgrhD1+1p-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>grhD1+1p-cat</i> , que lleva la región -250 a +27 ^a , Amp ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
pgrhD1+1s-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>grhD1+1s-cat</i> , que lleva la región +16 a +270 ^a , Amp ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
pgrhD2-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>pgrhD2-cat</i> , que lleva la región -193 a +113 ^a , Amp ^R	(Manzo-Durán R., no publicado)
ppagK-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>pagK-cat</i> , que lleva la región -880 a +251 ^a , Amp ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
philA-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilA-cat</i> , que lleva la región -410 a +466 ^a , Amp ^R	(Bustamante <i>et al.</i> , 2008)
psirA-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>sirA-cat</i> , que lleva la región -563 a +98 ^a , Amp ^R	(Martínez <i>et al.</i> , 2011)
pinvF-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>invF-cat</i> , que lleva la región -306 a +213 ^a , Amp ^R	(Bustamante <i>et al.</i> , 2008)
philD-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>hilD-cat</i> , que lleva la región -364 a +88 ^a , Amp ^R	(Bustamante <i>et al.</i> , 2008)
pphoP-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>phoP-cat</i> , que lleva la región -	Este trabajo

	167 a +77 ^a , Amp ^R	
psprB-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>psprB-cat</i> , que lleva la región -497 a +144 ^b , Amp ^R	Este trabajo
pslrP-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>pslrP-cat</i> , que lleva la región -510 a +101 ^a , Amp ^R	Pérez-Morales D., no publicado
pugtL-cat	Derivado de pKK232-8, contiene la fusión transcripcional <i>pugtL-cat</i> , que lleva la región -436 a +216 ^a , Amp ^R	Pérez-Morales D., no publicado
pMPM-K3	Vector de clonación de bajo número de copias; origen P15A, Km ^R	(Mayer, 1995)
pK3-PhoP	Derivado de pMPM-K3, contiene el gen estructural <i>phoP</i> y el sitio de unión al ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> , Km ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
pK3-SirA	Derivado de pMPM-K3, contiene el gen estructural <i>sirA</i> y el sitio de unión al ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> , Km ^R	(Martínez <i>et al.</i> , 2011)
pK3-GrhD1	Derivado de pMPM-K3, contiene el gen estructural <i>grhD1</i> y el sitio de unión al ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> , Km ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
pK3-GrhD1-FLAG	Derivado de pMPM-K3, contiene el gen estructural <i>grhD1::3XFLAG</i> y el sitio de unión al ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> , Km ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
pK3-GrhD2-FLAG	Derivado de pMPM-K3, contiene el gen estructural <i>grhD2::3XFLAG</i> y el sitio de unión al ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> , Km ^R	Este trabajo
pK3-YobH-FLAG	Derivado de pMPM-K3, contiene el gen estructural <i>yobH::3XFLAG</i> y el sitio de unión al ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> , Km ^R	Este trabajo
pK3-AvrA-FLAG	Derivado de pMPM-K3, contiene el gen estructural <i>avrA::3XFLAG</i> y el sitio de unión al ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> , Km ^R	Este trabajo
pMPM-K6Ω	Vector de clonación de bajo número de copias, origen de replicación p15A, bajo un promotor inducible por arabinosa, Km ^R	(Mayer, 1995)
pK6-HiID	Derivado de pMPM-K6Ω, expresa a HiID bajo un promotor inducible por arabinosa, Km ^R	(Martínez-Flores <i>et al.</i> , 2016)
pK6-SprB	Derivado de pMPM-K6Ω, expresa a SprB bajo un promotor inducible por arabinosa, Km ^R	Este trabajo

pMPM-T6Ω	Vector de clonación, origen de replicación p15A, con un promotor inducible por arabinosa, Tc ^R	(Mayer, 1995)
pT6-HNS-WT	Derivado de pMPM-T6Ω, expresa H-NS silvestre bajo un promotor inducible por arabinosa, Tc ^R	(Bustamante <i>et al.</i> , 2008)
pT6-HNS-G113D	Derivado de pMPM-T6Ω, expresa H-NS dominante negativo, mutado en su C-terminal en la posición 113 (H-NS ^{G113D}), bajo un promotor inducible por arabinosa, Tc ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
p2795	Derivado de pBluescript SK+, contiene <i>aph</i> FRT, Amp ^R , Km ^R	(Husseiny and Hensel, 2005)
p2795-GrhD1-FLAG	Derivado de p2795, contiene los genes <i>grhD1::3XFLAG</i> y de resistencia a kanamicina, flanqueados por FRT's, Amp ^R , Km ^R	(Banda <i>et al.</i> , 2018)
p2795-GrhD2-FLAG	Derivado de p2795, contiene los genes <i>grhD2::3XFLAG</i> y de resistencia a kanamicina, flanqueados por FRT's, Amp ^R , Km ^R	Este trabajo
pKD4	Derivado de pANTS _γ ; contiene el gen de resistencia a Km, flanqueado por FRT's	(Datsenko and Wanner, 2000)
pSUB11	Derivado de pGP704, contiene el gen de resistencia a kanamicina y la secuencia completa del epítipo 3XFLAG	(Uzzau <i>et al.</i> , 2001)
pKD46	Derivado de pINT-ts, contiene el sistema de recombinación del fago λRojo bajo el control de un promotor inducible por arabinosa; Amp ^R	(Datsenko and Wanner, 2000)
pCP20	Plásmido de replicación termo-sensible e inducción térmica de la síntesis de la recombinasa FLP.	(Datsenko and Wanner, 2000)

* Las coordenadas de las fusiones transcripcionales son con respecto al sitio de inicio de la transcripción primario (a) o a la primera base del codón de inicio (b), para cada gen.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados

Nombre	Secuencia (5'-3')	Modificación
Construcción de la fusión <i>grhD1L-cat</i>		
1872FW-1	CAGGTCGACAAGATCGCGCTCTGACCG	Sall
1872Rv-3	CAGGGATCCAAAACCGTTTACTACGCTGGTC	BamHI
Construcción de la fusión <i>grhD1+1p-cat</i>		
1872FW-1	CAGGTCGACAAGATCGCGCTCTGACCG	Sall
1872Rv+1s	CTGGGATCCCGCGGAAGACATGATTAAGGC	BamHI

Construcción de la fusión *grhD1+1s-cat*

1872Fw+1p	GCC <u>GT</u> CGACATGTCTTCCGCGATAACACAG	Sall
1872Rv-3	CAGGGATCCAAAACCGTTTACTACGCTGGTC	BamHI

Construcción de la fusión *phoP-cat*

PhoP-RV33	GCTGAAGCTTCAGGTGGTGGCG	HindIII
PhoP-FW44	AAAGGATCCTTAAAGCCATGACGCCGGC	BamHI

Construcción de la fusión *sprB-cat*

sprB-catF	CAGA <u>AGCTT</u> GTCCGGCATATCGGATAGGG	HindIII
sprB-catR	CTGGGATCCTTTACAAGTCGCGACGATGTG	BamHI

Construcción de los plásmidos pK3-GrhD1 y pK3-GrhD1-FLAG

1872Fw-K3	GAAGAGCTCGCACAAAAGGAGGATCAG	SacI
1872Rv-K3	TATGGTACCTACTATCTGGAGCTGATTCTG	KpnI

Construcción del plásmido pK3-GrhD2-FLAG

1770Fw-K3	TTCGGTACCTGTACACGCTACTCTTATTCTAAC	KpnI
1770Rv-K3	GGAGAGCTCCGTAAAAGTAGATAATATCTGTCTG	SacI

Construcción del plásmido pK3-YobH-FLAG

YobHFw-K3	TTCGGTACCTATTGCCGCTACGATTAAGCG	KpnI
YobHRv-K3	GAGGAGCTCAACCTGTCCGAATATCAAACAG	SacI

Construcción del plásmido pK3-AvrA-FLAG

AvrA-k3Rv	TCAGGTACCGGTGGTTGGTAGCCTGGC	KpnI
AvrA-k3Fw	CTTGAGCTCCTGCTATTCAGGAAACATACG	SacI

Construcción del plásmido pK6-SprB

sprB-K6NcoI	AATCCATGGGAAATGTAATTATATACGGTATTAAGT	NcoI
sprB-K6PstI	TGCCTGCAGAAATATGCCTCAATGATTGAGCCAG	PstI

Construcción del plásmido p2795-GrhD1-FLAG

1872-SallFw	GAAGTCGACGCACAAAAGGAGGATCAG	Sall
1872Rv-3	CAGGGATCCAAAACCGTTTACTACGCTGGTC	BamHI

Construcción del plásmido p2795-GrhD2-FLAG

1770-SallRv	GGAGTCGACCGTAAAAGTAGATAATATCTGTCTG	Sall
SL1770-FW22	CCTGGATCCACAGCAACAGGCATACTAC	BamHI

Construcción de la mutante $\Delta invC::km$

invCH1P1	ATGAAAACACCTCGTTTACTGCAATATCTGGCCTACCCACAATGTAGG CTGGAGCTGCTTCG
invCH2P2	TTAATTCTGGTCAGCGAATGCATTCATACCGCTCAACGTGTCCATATG AATATCCTCCTTAG

Caracterización de la mutante $\Delta invC::km$

invCFw-01	GATCGCCTCCTCCTCGGC
invCRv-02	GCAATTACTACTGGGGGAGC

Construcción de la mutante $\Delta ssaV::km$

SssaV-H1P1 TGC GCGGGT CGGCAGGATATGGTTCTGGCGACGGTGTATTATGTA
GGCTGGAGCTGCTTCG
SssaV-H2P2 CTCTCCTAATTCCTGCCATGACAAAATCGGTACGTCGAACAACATATG
AATATCCTCCTTAG

Caracterización de la mutante Δ ssaV::km

ssaV-5' ATACTCAAGCAAACCTTCTTAG
ssaV-3' CATAAATACCCCAGGCAACC

Construcción de la mutante Δ sprB::km

sprB-H1P1 TCAAAAAAGGATAAATAAATGAGAAATGTAATTATATACGGTTGTAGG
CTGGAGCTGCTTCG
sprB-H2P2 ATGATAAAAAATATTTAATTCATTCTACCGCAATCGGTAACATATGA
ATATCCTCCTTAG

Caracterización de la mutante Δ sprB::km

sprB-FBamHI GAGGGATCCTACCAACCACCTCCGGATG
sprB-RHindIII TCTAAGCTTATTACCTTTGTAGTAAGAAGG

Construcción de la mutante Δ siiE::km

siiE-H1P1 ATGGGAAATAAAAGCATACAAAAGTTTTTTGCCGATCAAATTGTAGG
CTGGAGCTGCTTCG
siiE-H2P2 TTATGCGTGTTCTTCTTGATTATCTACAGGTAGCGTAACTTCCATATG
AATATCCTCCTTAG

Caracterización de la mutante Δ siiE::km

siiE-Fw01 CTGTTGACGCCAGTGTAATTAC
siiE-Rv01 CTATAGATAATGCCGTTTCCGC

Construcción de la mutante complementada Δ grhD1 + grhD1-FLAG-km

1872FLAG-H2P2 GCCAGGAAGCGCTCGCCCCACACAAAAGCGAGAGATGGGTTTTAAT
ACGACTCACTATAGGGCG
1872Rv+1s CTGGGATCCC GCGGAAGACATGATTAAGGC

Caracterización de la mutante complementada Δ grhD1 + grhD1-FLAG-km

1872FW-2 CCGCAGTAATCAGACCGTC
1872Rv-3 CAGGGATCCAAAACCGTTTACTACGCTGGTC

Construcción de la mutante complementada Δ grhD2 + grhD2-FLAG-km

1770FLAG-H2P2-C TTATGAACAACAGCCAATATAGGGGAATTATTGGTGATAGTTTAATAC
GACTCACTATAGGGCG
SL1770-FW22 CCTGGATCCACAGCAACAGGCATACTAC

Caracterización de la mutante complementada Δ grhD2 + grhD2-FLAG-km

SL1770-RV02 GCTACGAAAAATGTAGCTGC
SL1770-FW22 CCTGGATCCACAGCAACAGGCATACTAC

Etiquetado del gen *avrA* con epítipo FLAG

avrAFLAG-F CATAAAAAAAGGATAGCTGAATATAAGTCTTTACTTAAACCGGACTAC
AAAGACCATGACGG
avrAFLAG-R GCGCTGGAAGGATTTCTCTGGCAGGCAACCTTATAATTTACATAT
GAATATCCTCCTTAG

Caracterización de la cepa *avrA*-FLAG

avrAFW-01 GCGCGACAGGCGTAATGAA
avrARV-02 GGTGGTTGGTAGCCTGGC

Etiquetado del gen *yobH* con epítipo FLAG

EyobHFLAG-F TGCCCGCTGTTACGCAAAAAGCAATATCGTGGTCGATAATGGTGACTA
CAAAGACCATGACGG

EyobHFLAG-R GAGTATTTTACTCAGGAGTGAGAATCTGGTTATTTATTGCCCCATATG
AATATCCTCCTTAG

Caracterización de la cepa *yobH*-FLAG

yobH-Fw22 CCTGGATCCAAAGCAGCAAGCAAGCCAAC

yobH-Rv02 CCTGTCCGAATATCAAACAGAC

Caracterización de las mutantes y genes etiquetados con el epítotope FLAG

K1 CAGTCATAGCCGAATAGCCT

K2 CGGTGCCCTGAATGAACTGC

Ensayos de retardo:

		Gen blanco
1872FW-1	CAGGTCGACAAGATCGCGCTCTGACCG	<i>grhD1</i>
1872RV-2	TGAGGATCCTGAGCTGATATCACTGGC	<i>grhD1</i>
1872Rv-3	CAGGGATCCAAAACCGTTTACTACGCTGGTC	<i>grhD1</i>
hilA1FBamHI	ATCGGATCCCTCTGAGAACTATTTGC	<i>hilA</i>
hilA2RHindIII	GACAAGCTTTTCTGAGCGTAGCAGGG	<i>hilA</i>
sigDBH1F	TCCCGACAGGATCCTTTTACCC	<i>sigD</i>
sigDH3R	CGTTGTATAAGCTTTTTTGTAG	<i>sigD</i>
stm1939 Fwd	ATCCAGAATCAGCTCC	<i>grhD1</i>
stm1939 rv	CCGCCTCACCGATAAT	<i>grhD1</i>
ges1	AATTTTGAATGTTCTAC	<i>ges</i>
ges2	CAAGCGTATTCAGGCTGCACGGTTC	<i>ges</i>
orgB PE 3	GCGTTTTACGCTTTATCAGTATCC	<i>orgB</i>
PROM 2869	GCAAGGCTCCCTGCCT	<i>orgB</i>
nucA FW	GGCAAGACGCGCAACTGG	<i>nucA</i>
nuclease RV	CCGAAGGGCGCCG	<i>nucA</i>
SsaBFBgIII	GGCTAAGATCTTCGGCCCTGATATCCTG	<i>ssrAB</i>
SsrBRS6E	TTGGTCGACCGACAGATAGATGCCGG	<i>ssrAB</i>
SL1770-FW22	CCTGGATCCACAGCAACAGGCATACTAC	<i>grhD2</i>
SL1770-RV11	GTAAAGCTTACTTCCCACCAGGATGCC	<i>grhD2</i>
sprB-catF	CAGAAGCTTGTCCGGCATATCGGATAGGG	<i>sprB</i>
sprB-catR	CTGGGATCCTTTCACAAGTCGCGACGATGTG	<i>sprB</i>
PPK-Fw1	GCGAAGCTTAAATGCTAACCAGCTCAGTTC	<i>ppK</i>
PPK-Rv1	ATCGGATCCTCTGATTCCGAACAGCGTG	<i>ppK</i>

8.1. Medios de cultivo

Los cultivos bacterianos se crecieron en medio LB, que contiene 0.1% triptona, 0.5 % extracto de levadura y 0.1% NaCl, ajustado a pH 7.5; en MM-N (medio mínimo

N), que contiene 5 mM KCl, 7.5 mM (NH₄)₂SO₄, 0.5 mM K₂SO₄, 1mM KH₂PO₄, 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 μM MgCl₂ y 0.1% casaminoácidos; en medio PCN (Phosphate-Carbon-Nitrogen), que contiene 80 mM MES (pH 5.8), 4 mM Tricina, 100 μM FeCl₃, 376 μM K₂SO₄, 50 mM NaCl, 0.4 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 5.8), 0.4% glucosa, 15 mM NH₄Cl, 1 mM MgSO₄, 10 μM CaCl₂ y micronutrientes (10 nM Na₂MoO₄, 10 nM Na₂SeO₃, 4 nM H₃BO₃, 300 nM CoCl₂, 100 nM CuSO₄, 800 nM MnCl₂, 1 nM ZnSO₄); o en medio ISM (Intracellular salt medium), que contiene 170 mM K₂HPO₄, 0.5 mM MgSO₄, 1 μM CaCl₂, 6 mM K₂SO₄, 5 mM NH₄Cl, 5 mM NaCl, 0.4% glucosa y 2 μg/ml ácido nicotínico. Cuando fue necesario, los medio fueron suplementados con los siguientes antibióticos: ampicilina (200 μg/ml), estreptomina (100 μg/ml), kanamicina (20 μg/ml) o tetraciclina (12 μg/ml).

8.2. Construcción de plásmidos

En las Tablas 2 y 3 se indican los plásmidos utilizados y construidos, así como los oligonucleótidos utilizados. Para construir los plásmidos que contienen las fusiones transcripcionales pgrhD1L-cat, pgrhD1+1p-cat, pgrhD1+1s-cat, diferentes segmentos de la región reguladora de *grhD1* fueron amplificados por PCR con los pares de oligonucleótidos 1872FW-1/1872Rv-3, 1872FW-1/1872Rv+1s y 1872Fw+1p/1872Rv-3, respectivamente. Para construir los plásmidos que contienen las fusiones transcripcionales pphoP-cat y psprB-cat, la región reguladora completa de *phoP* o *sprB* se amplificó por PCR utilizando los pares de oligonucleótidos PhoP-FW44/PhoP-RV33 y sprB-catF/sprB-catR, respectivamente. En estas reacciones se usó como molde DNA cromosomal de la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344. A continuación, el producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE (Tris-Acetato-EDTA 0.5X, pH 8.0) a 80 V. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 μl/mg) y el DNA visualizado en un transiluminador de luz UV de onda corta (Sigma), permitió identificar la banda del tamaño correspondiente a la región amplificada para cortarla y purificarla mediante el kit “Zymoclean Gel DNA Recovery kit” (Zymo Research). Posteriormente los fragmentos purificados de los recortes de *grhD1* fueron digeridos con las enzimas de restricción Sall/HindIII y los de las regiones completas de *phoP/sprB* con las enzimas de restricción BamHI/HindIII; estos productos de PCR digeridos fueron purificados con el kit “DNA Clean & Concentrator” (Zymo Research) y después fueron ligados en el plásmido pKK232-8 digerido con los mismos pares de enzimas.

Para construir los plásmidos pK3-GrhD1 y pK3-GrhD1-FLAG, el gen *grhD1* fue amplificado por PCR usando el par de oligonucleótidos 1872Fw-K3/1872Rv-K3 y como molde DNA cromosomal de las cepas WT y *grhD1::3XFLAG* de *S. Typhimurium* SL1344, respectivamente. Para construir los plásmidos pK3-GrhD2-FLAG y pK3-YobH-FLAG, los genes *grhD2* y *yobH* fueron amplificados por PCR usando los pares de oligonucleótidos 1770Fw-K3/1770Rv-K3 y YobHFw-K3/YobHRv-K3, respectivamente, y como molde DNA cromosomal de la cepa *grhD2::3XFLAG* de *S. Typhimurium* SL1344 o DNA cromosomal de la cepa *yobH::3XFLAG* de *E. coli* MG1655, según fue el caso. Para construir el plásmido pK3-AvrA-FLAG, el gen *avrA* fue amplificado por PCR usando el par de oligonucleótidos AvrA-k3Fw/AvrA-k3Rv y como molde DNA cromosomal de la cepa *avrA::3XFLAG* de *S. Typhimurium* SL1344. Estos productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% y purificados. Posteriormente, los productos de PCR purificados fueron digeridos con las enzimas de restricción KpnI/SacI y los productos digeridos fueron purificados y ligados en el vector pMPM-K3 digerido con las mismas enzimas. Los plásmidos pK3-GrhD1, pK3-GrhD1-FLAG, pK3-GrhD2-FLAG, pK3-YobH-FLAG y pK3-AvrA-FLAG, expresan a GrhD1, GrhD1-FLAG, GrhD2-FLAG, YobH-FLAG y AvrA-FLAG, respectivamente, a partir del promotor *lac* del vector.

Para construir el plásmido pK6-SprB, el gen *sprB* fue amplificado por PCR usando el par de oligonucleótidos sprB-K6NcoI/sprB-K6PstI y como molde DNA cromosomal de las cepas WT de *S. Typhimurium* SL1344. El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 1% y purificado. Posteriormente, el PCR purificado fue digerido con las enzimas de restricción NcoI/PstI y el producto digerido fue purificado y ligado en el vector pMPM-K6 Ω digerido con las mismas enzimas. El plásmido pK6-SprB expresa a SprB a partir de un promotor inducible por arabinosa.

Para construir los plásmidos p2795-GrhD1-FLAG y p2795-GrhD2-FLAG, los genes *grhD1* y *grhD2*, respectivamente, fueron amplificados por PCR usando el par de oligonucleótidos 1872-SalI Fw/1872Rv-K3 y SL1770-FW22/1770-SalI Rv, respectivamente, y como molde DNA cromosomal de las cepas *grhD1::3XFLAG* y *grhD2::3XFLAG* de *S. Typhimurium* SL1344, según fue el caso. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% y purificados. Posteriormente, los productos de PCR purificados fueron digeridos con las enzimas de restricción SalI/BamHI y los productos digeridos fueron purificados y

ligados en el vector p2795 digerido con las mismas enzimas. Los plásmidos p2795-GrhD1-FLAG y p2795-GrhD2-FLAG fueron utilizados como templados en reacciones de PCR que se describen en el apartado “Construcción de cepas mutantes”.

En todos los casos descritos anteriormente, para las reacciones de ligación se cuantificó la concentración de DNA de los fragmentos a insertar y vector mediante un “NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer” (Thermo scientific. De acuerdo a las cantidades observadas en éste, el producto de PCR y el vector se ligaron poniéndolos en la reacción de ligación en una proporción aproximada de 5:1 molar. Esta reacción se incubó a 16°C toda la noche; al día siguiente la ligación se precipitó usando glicógeno, para lo cual se les agregó 1 µl de glicógeno (20 mg/ml) (Roche) y posteriormente 500 µl de etanol absoluto, dejando incubar durante 30 min a -20 °C. Posteriormente se centrifugaron 15 min a 14,000 rpm, decantando el sobrenadante obtenido. Se agregó 1 ml de etanol al 70%, se volvió a centrifugar en las condiciones anteriores y se desechó perfectamente el sobrenadante. Los contenidos de los tubos se desecaron en Speedvac sc100 (Savant) y los precipitados se resuspendieron en 10 µl de agua MQ, de los cuales 5 µl se utilizaron para transformar la cepa *E. coli* DH10β. Para confirmar que la clonación del fragmento de DNA en el vector se llevó a cabo, se purificaron plásmidos de varias transformantes de *E. coli* DH10β mediante el protocolo descrito en el apartado “Purificación de plásmidos por miniprep”, mismos que fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%. Aquellos plásmidos que contenían un inserto, fueron utilizados para amplificar por PCR el inserto que contenían y así corroborar su tamaño. Se seleccionaron los plásmidos que tuvieran el inserto correcto y se purificaron con el estuche “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche). Finalmente se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM para obtener y verificar la secuencia de nucleótidos.

8.3. Purificación de plásmidos por “miniprep”

Las cepas que contienen los plásmidos de interés se cultivaron en 5 ml de LB adicionado con los antibióticos adecuados incubándose durante toda la noche a 37 °C con agitación a 200 rpm. Los 5 ml de los cultivos se concentraron, centrifugando consecutivamente 2 min a 14,000 rpm y desechando el sobrenadante. Las pastillas de bacterias se resuspendieron en 150 µl de buffer SET. Posteriormente se agregaron 8 µl de RNAsa (10 mg/ml) y esta suspensión

se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Transcurrido ese tiempo las bacterias se lisaron al agregarse 400 μ l de solución de lisis (NaOH 0.2 M, SDS 1%) e incubando en hielo. Después de 5 min se agregaron 300 μ l de acetato de amonio 7.5 M pH 7.8 y se incubó en hielo durante 10 min más, para posteriormente centrifugar durante 10 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se le agregaron 500 μ l de isopropanol. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y después se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue desechado y se agregó 1 ml de etanol al 70%. Posteriormente se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm, el sobrenadante fue desechado y la pastilla de DNA se desecó completamente, para finalmente resuspenderla en 60-100 μ l de agua.

8.4. Preparación de células electrocompetentes

Las diferentes cepas de interés se cultivaron en 5 ml de LB adicionado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al otro día, se emplearon 1 ml de estos cultivos para inocular un matraz de 250 ml con 100 ml de LB adicionado con los mismos antibióticos. Estos cultivos se incubaron durante 2 a 3 h a 37°C a 200 rpm, hasta que alcanzaron una D.O._{600nm} de 0.6 a 0.8. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron por 8 min a 8,000 rpm a 4°C en tubos Nalgene, se desechó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 30 ml de agua MQ fría estéril y se centrifugó en las mismas condiciones. Después, el sobrenadante se desechó, se resuspendió la pastilla en 30 ml de glicerol al 10% estéril frío y se procedió a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 500 μ l de glicerol al 10% estéril frío.

8.5. Electroporación

Se mezclaron 40 μ l de células electrocompetentes con 5 μ l de DNA plasmídico. Esta mezcla se colocó en una celda de electroporación fría (BIORAD) y se le dio un pulso eléctrico de 2.5 kV durante 5.5 ms usando un electroporador “*E. coli* pulser” (BIORAD). Posteriormente, se agregó a la celda 1 ml de medio de cultivo SOC y se mezcló, después se transfirió el contenido a un tubo de ensayo y se incubó durante 1 h a 37°C con agitación a 200 rpm. Finalmente, se sembraron 250 μ l del cultivo en cajas Petri con medio LB solidificado conteniendo agar al

1.5% con los antibióticos correspondientes e incubándose a 37°C durante 16 h aproximadamente.

8.6. Construcción de cepas mutantes

La mutagénesis se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Datsenko y Warner (Datsenko and Wanner, 2000). La estrategia general se basó en reemplazar a los genes a deletar en la cepa *S. Typhimurium* SL1344 (Tabla 1), con un gen seleccionable de resistencia a kanamicina que es generado por PCR utilizando oligonucleótidos que tienen 42 nucleótidos homólogos al gen que se desea remover (H1 y H2) más la secuencia correspondiente a P1 y P2 del plásmido pKD4 (20 nucleótidos) (Tabla 3). En este procedimiento, la recombinación requiere la recombinasa del fago λ Rojo, la cual es sintetizada bajo el control de un promotor inducible por arabinosa en un plásmido de bajo número de copias (pKD46) (Tabla 2).

Inicialmente, se amplificó mediante PCR el gen cuyo producto confiere resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4, empleando los oligonucleótidos H1P1 y H2P2 correspondientes al gen a eliminar (Tabla 3). Se prepararon 5 mezclas de reacción de PCR y los productos se concentraron en uno solo. Para esto, se agregaron 100 μ l de acetato de amonio pH 7.8, 300 μ l de fenol y 300 μ l de cloroformo alcohol isoamílico, se mezcló y se centrifugó durante 5 min a 14,000 rpm. Después se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó 1 ml de etanol absoluto, se agitó y se dejó precipitar durante 1 h a -70°C. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó durante 30 min a 14,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70%. Después se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en 7 μ l de agua. Se utilizó 1 μ l de este producto para una electroforesis en gel de agarosa al 1% con la finalidad de revisar el producto concentrado.

Por otra parte, se puso un pre-inóculo de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene el plásmido pKD46 en una caja de LB adicionada con ampicilina y se incubó durante toda la noche a 30°C. Al otro día se inocularon 40 colonias en 25 ml de SOB suplementado con 2.5 ml de L-arabinosa 1M y ampicilina, y se incubaron a 30°C con agitación hasta una D.O._{600nm} de 0.6. Estas células fueron preparadas para una transformación, para lo cual se centrifugaron durante 10 min

a 8,000 rpm a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 ml de agua fría estéril. Posteriormente se centrifugó durante 5 min a 8,000 rpm a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de agua fría estéril, se repitió este paso de lavado 2 veces para finalmente resuspender la pastilla en 100 µl de agua fría estéril. 50 µl de estas células electrocompetentes fueron transformadas por electroporación con 3 µl del producto de PCR concentrado y se incubaron en 1 ml de medio SOC durante 3 h a 30 °C. Posteriormente se sembraron 300 µl en agar LB adicionado con kanamicina y se incubaron a 42°C durante toda la noche. Las transformantes que se obtuvieron, se resembraron en agar LB adicionado con kanamicina a 42°C con el fin de separar colonias. Finalmente se sembraron en medio LB adicionado con estreptomina, kanamicina o ampicilina, con el fin de analizar resistencia o sensibilidad a los antibióticos. Para la caracterización de las mutantes con aquellas colonias que fueron resistentes a kanamicina y sensibles a ampicilina se realizaron distintos PCR con varios juegos de oligonucleótidos (Tabla 3) que permiten amplificar regiones del gen de resistencia a kanamicina y/o las regiones que los flanquean. Todas las cepas mutantes fueron verificadas mediante secuenciación de los productos de PCR.

Para la construcción de las cepas mutantes complementadas en el cromosoma, se siguió la metodología descrita anteriormente pero con los siguientes cambios:

En el paso de la amplificación mediante PCR del gen de resistencia a kanamicina, éste se amplificó junto con el gen que se quiso insertar, utilizando como molde el plásmido p2795 que contiene al gen a insertar. Por otro parte, la cepa de *S. Typhimurium* que se utilizó para preparar células competentes y transformarlas, fue la cepa mutante a complementar conteniendo el plásmido pKD46.

8.7. Construcción de cepas que expresan genes etiquetados con el epítoto FLAG

Para etiquetar al gen cromosomal deseado con el epítoto FLAG (3XFLAG), se empleó una modificación del sistema del fago λ Rojo para la mutagénesis, descrito previamente (Datsenko and Wanner, 2000). Esta modificación consiste en agregar en fase el epítoto FLAG al final del gen cromosomal que se requiere etiquetar, sustituyendo de esta manera el codón de término (Uzzau *et al.*, 2001).

Para esto se utilizaron oligonucleótidos con homología a las regiones que flanquean el codón de término del gen, y que a su vez también tienen homología con regiones del plásmido pSUB11, que se usó como molde para amplificar el epítipo 3XFLAG junto con el gen de resistencia a kanamicina (3XFLAG-km). Una vez obtenidos los productos de PCR, se procedió de la misma manera que en el apartado “Construcción de cepas mutantes”. Cuando el gen a etiquetar era de *E. coli*, se utilizó la cepa de *E. coli* MG1655 que contiene el plásmido pKD46. Al final se seleccionaron aquellas cepas cuyos productos de PCR correspondían al tamaño del epítipo 3XFLAG-km. Todas las cepas etiquetadas fueron verificadas mediante secuenciación de los productos de PCR.

8.8. Transducción con el fago P22

La generación de cepas mutantes o el etiquetado de genes a través de la transducción con el fago P22, se describe a continuación. Primero se replicó el fago en células de *S. Typhimurium* WT poniendo un inóculo de esta cepa en 5 ml de LB y se incubó durante toda la noche a 37°C a 200 rpm. Al día siguiente se agregó 1 ml de medio P22 (que contiene los fagos P22 y 20% de glucosa) a 200 µl del pre-inóculo y se incubó durante toda la noche a 37°C a 200 rpm. Posteriormente, se transfirió el cultivo a tubos eppendorf de 1.5 ml, se centrifugaron durante 2 min a 13,000 rpm, se transfirió el sobrenadante a otro tubo de 1.5 ml, se añadieron varias gotas de cloroformo, se agitó con vórtex y se guardaron a 4°C.

Para obtener los fagos P22 con los genes mutados o etiquetados con FLAG se replicaron los fagos en la cepa de *S. Typhimurium* donadora (la cepa que contiene el fragmento a transducir) repitiendo los pasos anteriormente descritos.

Para la transducción, se preparó un inóculo de la cepa receptora de *S. Typhimurium* en 5 ml de LB adicionado con los antibióticos adecuados y se creció durante toda la noche a 37°C a 200 rpm. Al siguiente día se realizaron las mezclas indicadas en la tabla 4 en tubos eppendorf estériles de 1.5 ml y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min para permitir la adsorción del fago. Después, se agregó 1 ml de LB a cada tubo y se incubaron durante 1 h a 37°C a 200 rpm. Después de ese tiempo, se centrifugaron los tubos durante 3 min a 14,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla de bacterias con 200 µl de LB; se mezcló con vórtex y se centrifugó durante 3 min a 14,000 rpm. Se

repite el paso de lavado dos veces más. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de bacterias en 100 μ l de LB. Se plaquearon los 100 μ l en cajas de LB con kanamicina y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se seleccionaron 3 colonias, se estriaron a colonia sencilla hasta realizar 3 pases en cajas de LB con kanamicina. Después, se seleccionaron 3 colonias y se rayaron en cajas con LB con kanamicina y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Entonces, se verificó por PCR la mutación o el etiquetado de los genes, con un par de oligonucleótidos externos y los K1 y K2 (tabla 3).

Tabla 4. Mezclas utilizadas durante la transducción con el fago P22

Tubo	Células	Fago P22
A (control)	200 μ l	---
B (control)	---	5 μ l
C	200 μ l	1 μ l
D	200 μ l	5 μ l
E	200 μ l	20 μ l

8.9. Cultivos bacterianos para cuantificar la expresión de los genes

✓ Medio LB

Las cepas que contienen genes etiquetados con el epítotope de 3XFLAG o plásmidos que llevan las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, se cultivaron en 5 ml de medio LB adicionado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, se tomaron 500 μ l de cada cultivo y se inocularon por cada cepa a evaluar 2 matraces de 250 ml con 50 ml de LB adicionado con los mismos antibióticos. Estos cultivos se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante 9 h. Se tomaron muestras de 1 ml de cultivo a las 9 h para analizar la expresión de las diferentes fusiones transcripcionales o para la detección de proteínas por medio de Western blot. Posteriormente se procedió a centrifugar todas las muestras durante 2 min a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas obtenidas se procesaron como se indica en el apartado “Inmunodetección de proteínas mediante Western blot”. En cambio, cuando las pastillas se utilizaron para la cuantificación de la actividad de específica de CAT, éstas se lavaron con

800 μ l de solución de lavado TDTT (Tris-HCl, pH 7.8 50 mM, y DL-ditiotreitol 30 μ M), y después de centrifugar en las mismas condiciones que anteriormente, se desechó el sobrenadante. En caso de no utilizar las pastillas inmediatamente, se almacenaron a -20°C , de lo contrario, se resuspendieron en 800 μ l de TDTT.

✓ **Medio MM-N**

De igual forma que para la cuantificación de la expresión de los genes en medio LB, las cepas que contienen los plásmidos que llevan las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, se cultivaron en 5 ml de medio LB adicionado con los antibióticos para los que tienen resistencia y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente se hicieron dos pastillas centrifugando 1.5 ml de los cultivos y se les dio un lavado con 1 ml de medio MM-N. Posteriormente las pastillas se resuspendieron en 500 μ l de MM-N y con cada una de ellas se inocularon dos matraces con 50 ml de MM-N. Los cultivos se incubaron durante 16 h a 37°C en agitación a 200 rpm, hora a la cual se tomó una muestra de 1.5 ml, también midiéndose la densidad óptica de los cultivos a 600 nm. Las muestras se centrifugaron durante 2 min y se desechó el sobrenadante. Las pastillas obtenidas se lavaron con 700 μ l de solución de lavado TDTT. En caso de no utilizar las pastillas inmediatamente, se almacenaron a -20°C , de lo contrario, se resuspendieron en 700 μ l de TDTT.

✓ **Medio PCN**

Para la detección de la expresión de proteínas etiquetadas con el epítipo de 3XFLAG en medio PCN, las cepas se cultivaron en 5 ml de medio Lennox adicionado con los antibióticos para los que tienen resistencia y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente se hicieron dos pastillas centrifugando 25 μ l de los cultivos y se les dio dos lavados con 25 μ l de medio PCN. Posteriormente las pastillas se resuspendieron en 25 μ l de PCN y con cada una de ellas se inocularon dos matraces con 25 ml de PCN. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm, hasta que alcanzaron una $D.O._{600\text{nm}}$ de 0.3, en un tiempo aproximado de 9 h, momento en el cual se concentró el contenido del matraz centrifugando durante 8 min a 8,000 rpm y desechando el sobrenadante. Las pastillas bacterianas se procesaron como se indica en el apartado "Inmunodetección de proteínas mediante Western blot".

✓ Medio ISM

Para la detección de la expresión de proteínas etiquetadas con el epítipo de 3XFLAG en medio ISM, las cepas se cultivaron de forma similar que en el medio PCN. Al final, las pastillas bacterianas se procesaron como se indica en el apartado “Inmunodetección de proteínas mediante Western blot”.

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

La actividad de la enzima Cloranfenicol Acetil Transferasa fue medida usando una modificación de un método espectrofotométrico. Primero, las pastillas resuspendidas en TDTT fueron sonicadas durante 3 min en un sonicador “Vibra Cell”, con pulsos de 9.9 s y períodos de reposo de 9.9 entre cada pulso, obteniéndose un tiempo total de sonicación de 6 min. Posteriormente las muestras sonicadas fueron centrifugadas durante 15 min a 14,000 rpm y se transfirió el sobrenadante obtenido a tubos nuevos.

Para la cuantificación de las proteínas totales en los sobrenadantes obtenidos se utilizaron placas de cultivo celular de 96 pozos (Costar), donde se agregaron por duplicado 10 μ l de cada muestra por pozo, utilizando como blanco en el pozo correspondiente 10 μ l de TDTT. Después, se añadió a cada pozo 200 μ l de una mezcla (50:1) de los reactivos del estuche BCA “Protein Assay Reagent” (Pierce) y se incubó la placa durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se calculó la concentración de proteínas totales mediante la lectura de la absorbancia a 562 nm en un lector automatizado de microplacas tipo CERES 900 C (Bio-Tek Instruments Inc.), utilizando el programa KC3. Los valores obtenidos se interpolaron en una curva estándar de concentraciones de la proteína ASB (de 0 a 1.5 mg/ml) previamente almacenada en dicho programa.

Para calcular la actividad enzimática de CAT, 5 μ L de cada muestra fueron agregadas por duplicado en otra placa de cultivo celular de 96 pozos, seguido de 200 μ l de una mezcla de reacción de Tris-HCl pH 7.8 0.1 M, DTNB (ácido 5, 5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico) *Research Organics*) 1 mM, acetil-CoA 0.1 mM (Pharmacia Biotech) y cloranfenicol 0.1 mM (Sigma). La actividad de CAT se determinó, inmediatamente después de agregarse la mezcla de reacción, utilizando el mismo lector de microplacas posicionado en el modo de cinética, tomándose lecturas de absorbancia a 405 nm cada 5 s durante 5 min de reacción.

Los valores de actividad obtenidos de cada muestra se interpolaron en una curva estándar de actividad de CAT (de 0 a 2 500 U/ml), previamente almacenada en el programa KC3. Finalmente, la actividad específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) se obtuvo al dividir las unidades de actividad de CAT entre la concentración de proteínas totales de cada muestra.

8.11. Inmunodetección de proteínas mediante Western blot

Muestras de aproximadamente 1 ml de cultivos, crecidos de acuerdo a lo descrito previamente en el apartado de “Cultivos bacterianos para cuantificar la expresión de genes”, se centrifugaron durante 2 min a 13,000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas de bacterias obtenidas fueron resuspendidas en 500 μl de amortiguador de carga SDS-PAGE 1X. Estas muestras se calentaron a 95 °C durante 5 min y se corrieron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%, usando amortiguador de corrida Tris-Glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0.1%). Este gel se utilizó para la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de poro de 0.45 μm (Millipore), en una cámara de transferencia semi-seca (Bio-Rad), usando amortiguador de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20%, SDS 0.04%) durante 1 h a 15 V. Las membranas que contenían las proteína transferidas fueron bloqueadas con leche desgrasada al 5% en PBST (PBS 1X, Tween 20 0.03%) durante toda la noche. Posteriormente la membrana se incubó en agitación durante 3 h con el anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 (SIGMA) o el anticuerpo policlonal anti-GroEL (StressGen), diluidos en PBST 1:2,000 o 1:100,000, respectivamente. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó 3 veces con PBST en agitación durante 15, 10 y 10 min, respectivamente. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón (1:10,000) o anti-conejo (1:10,000) (PIERCE) para detectar al anticuerpo anti-FLAG o anti-GroEL, respectivamente. Las membranas se mantuvieron en agitación durante 1 h. Se realizaron de nuevo 3 lavados durante 15, 10 y 10 min, con PBST en agitación. A continuación se agregó una mezcla 1:1 de los reactivos para revelado “enhanced luminol reagent” y “oxidizing reagent” del estuche comercial para revelado “Western Lightning Chemiluminiscense Reagent Plus” (Perkin Elmer Life Sciences) y se mantuvieron en agitación durante 1 min. Finalmente las membranas se expusieron en películas radiográficas (KODAK-Omat-LS-film).

Los complejos H-NS-FH-DNA de los EMSAs competitivos se transfirieron y detectaron como se describió arriba, usando el anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 (SIGMA) y el anticuerpo secundario anti-ratón (PIERCE), diluidos en PBST 1:3,000 y 1:10,000, respectivamente.

8.12. Perfil de proteínas secretadas

Las cepas a estudiar se cultivaron en 5 ml de medio LB adicionado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, se inocularon 5 ml de LB con 50 µl del inóculo de toda la noche y se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm. A las 9 h de crecimiento se transfirieron 1.5 ml de cada tubo a 3 tubos eppendorf y estas muestras se centrifugaron 5 min a 14,000 rpm y se transfirieron 1.3 ml del sobrenadante a tubos nuevos. Cuando se requería detectar a las proteínas secretadas por medio de Western blot, los sobrenadantes se filtraron utilizando un filtro de 0.22 µm. Posteriormente se les agregaron 200 µl de ácido tricloroacético al 100% a los sobrenadantes y se dejaron precipitando así durante toda la noche a -20°C. Al día siguiente las proteínas precipitadas se concentraron por centrifugación durante 30 min a 14,000 rpm, se desechó el sobrenadante y las pastillas se disolvieron en 20 µl de buffer de carga SDS-PAGE 1X. Después a cada tubo se le añadió 2 µl de Tris-HCl 2M pH 11 y se calentaron a 95°C durante 5 min. Finalmente, las 3 muestras de cada cepa se juntaron en un solo tubo y fueron visualizadas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. Los geles fueron teñidos con colorante azul brillante de Coomassie (Brilliant blue R-250). Cuando las proteínas iban a ser detectadas por Western blot, los geles no se teñían y en su lugar las proteínas eran transferidas a una membrana de nitrocelulosa de poro de 0.45 µm (Millipore), como se describe en la sección “Inmunodetección de proteínas mediante Western blot”.

8.13. Ensayos de retardo en gel (EMSA's, Electrophoretic Mobility Shift Assays)

Para los EMSAs con MBP-HiLD o H-NS-FH, las regiones reguladoras de los genes a evaluar fueron amplificadas mediante PCR usando DNA cromosomal de *S. Typhimurium* SL1344 (Tabla 1) y los respectivos oligonucleótidos específicos (Tabla 3). Los productos de PCR fueron purificados usando el estuche comercial

“QIAquick PCR purification” (Qiagen). Para los EMSAs no competitivos, aproximadamente 100 ng de cada uno de los diferentes fragmentos de DNA se incubaron con concentraciones crecientes de la proteína purificada previamente MBP-HiID o H-NS-FH (Bustamante *et al.*, 2008), en un volumen total de 20 μ l. Las interacciones se realizaron a temperatura ambiente durante 20 min. Para los EMSAs competitivos entre HiID y H-NS, primero se incubaron los 100 ng del fragmento de DNA con una concentración constante (0.6 μ M) de la proteína H-NS-FH durante 15 min y transcurrido ese tiempo, se añadieron concentraciones crecientes de la proteína MBP-HiID, y las reacciones se incubaron durante otros 20 min. Las reacciones de retardo fueron realizadas en el buffer de unión que contiene 10 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 5% glicerol y 10 μ g/ml ASB. Los complejos proteína-DNA se separaron en un gel de poliacrilamida al 6% en condiciones no desnaturizantes en amortiguador de corrida Tris-boratos-EDTA 0.5X. Para la visualización de los complejos DNA-proteína, los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio 0.5 μ g/ml y se visualizaron en un transiluminador con luz UV de onda corta (Alpha-Imager UV transiluminator Innotech Corp.). Los EMSAs competitivos se realizaron por duplicado, un gel fue teñido con bromuro de etidio y el otro se utilizó para detectar a H-NS-FH en los complejos DNA-proteína por medio de Western blot, como se describe en el apartado “Inmunodetección de proteínas mediante Western blot”.

Para los EMSAs con PhoP-H6, los oligonucleótidos específicos fueron marcados con T4 polinucleótido quinasa y [γ - 32 P] ATP. Posteriormente, las regiones reguladoras de los genes a evaluar fueron amplificadas mediante PCR usando DNA cromosomal de *S. Typhimurium* SL1344 (Tabla 1) y los respectivos oligonucleótidos específicos marcados previamente (Tabla 3). Aproximadamente 6 fmol de cada fragmento de DNA marcado se incubó con concentraciones crecientes de la proteína purificada PhoP-H6 (Castelli *et al.*, 2000), la cual previamente fue fosforilada al incubarla con 25 mM de acetil fosfato durante 3 h a 25°C. Las interacciones se realizaron en un volumen total de 20 μ l a temperatura ambiente durante 30 min, utilizando un buffer de unión que contiene 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol y 25 μ g/ml ASB. Los complejos proteína-DNA se separaron en un gel de poliacrilamida al 8% en condiciones no desnaturizantes en amortiguador de corrida Tris-boratos-EDTA 0.5X. Para la visualización de los complejos DNA-proteína, los geles se secaron y fueron visualizados en un escáner láser Typhoon FLA 7000 IP.

8.14. Ensayo de movilidad en agar

Las cepas a estudiar (Tabla 1) se cultivaron en 5 ml de medio LB adicionado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, 50 µl del inóculo de toda la noche se inocularon en 5 ml de LB y se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm hasta una fase exponencial media (una D.O._{600nm} de aproximadamente 1.0). Muestras de cultivos (1 µl) de las cepas fueron sembradas en agar LB al 0.3%. Las cajas se incubaron durante 7 h a 37°C. Después de ese tiempo la movilidad fue visualizada como halos de difusión radial alrededor del inóculo inicial.

8.15. Ensayo de invasión a células HeLa, macrófagos y fibroblastos

La invasión en células HeLa (células epiteliales cervicales humanas, ATCC) o macrófagos RAW264.7 se realizó por medio de un ensayo de protección a la gentamicina como se ha descrito previamente (Ibarra *et al.*, 2010; Pérez-Morales *et al.*, 2017). Para esto, las células HeLa se crecieron en medio DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium", GIBCO 12100-046), suplementado con una solución de piruvato de sodio 10 mM (SIGMA S8636), L-glutamina 20 mM (GIBCO 25030-081) y 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (ByProductos 13001), a 37°C, 5% CO₂. Para los ensayos, se sembraron 1 x 10⁵ células/pozo (1 ml/pozo) en placas de 24 pozos (Costar 3524, Corning Incorporated ®) de 20 a 24 h antes de la infección para permitir su adhesión. Se colocaron las placas en una incubadora humidificada a 37°C, 5% de CO₂. Para la preparación de las bacterias, se estriaron las cepas a evaluar en cajas de LB con los antibióticos adecuados para obtener colonias aisladas. Se prepararon pre-inóculos a partir de una sola colonia de cada cepa crecidas en 3 ml de LB con los antibióticos adecuados y se incubaron durante 16-18 h a 37°C en agitación a 200 rpm. Transcurrido ese tiempo, se sub-cultivaron 600 µl de los pre-inóculos en 20 ml de LB sin antibióticos y se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.6-0.7 (dilución 1:5). Una vez que las bacterias alcanzaron la D.O. deseada, se centrifugó 1 ml de cada cultivo durante 2 min a 8,000 x g. Enseguida se removieron cuidadosamente 900 µl del sobrenadante sin deshacer la pastilla de bacterias. Después se resuspendieron las pastillas en 900 µl de PBS 1X estéril y se realizó una dilución 1:10 y 1:40 en DMEM, para infectar las células HeLa y los macrófagos, respectivamente. Posteriormente cada pozo conteniendo las mononocapas de células HeLa o macrófagos en cultivo se infectaron con 10 µl de

la dilución anterior y se movió la placa para mezclar (este fue el tiempo 0). Enseguida se incubó la placa a 37°C, 5% CO₂ durante 15 min. En algunos experimentos las monocapas de células fueron centrifugadas durante 10 min a 1,000 x g inmediatamente después de la adición de las bacterias y después se incubaron las placas por 10 min a 37°C, 5% CO₂. Transcurrido ese tiempo, se retiró el DMEM de cada uno de los pozos y se lavaron las monocapas de células 2 veces adicionando 1 ml de PBS 1X estéril a cada pozo, agitando cuidadosamente la placa y retirando el PBS. Una vez removido el PBS, se adicionó a cada pozo 1 ml de DMEM pre-calentado a 37°C y se incubó la placa a 37°C, 5% CO₂ durante 20 min. Posteriormente, se removió el DMEM de cada pozo y se agregó 1 ml de DMEM suplementado con gentamicina (50 µg/ml) para eliminar a las bacterias que no invadieron. Enseguida se incubó la placa a 37°C, 5% CO₂ durante 1 h. Después de ese tiempo, se lavaron las monocapas de células 1 vez adicionando a cada pozo 1 ml de PBS 1X estéril, agitando cuidadosamente la placa y removiendo el PBS. Enseguida se solubilizaron las monocapas de células adicionando solución de solubilización (deoxicolato de sodio al 0.2% en PBS 1X estéril) recién preparada, 1 ml para células HeLa y 200 µl para macrófagos, y pipeteando la solución sobre las capas de células 3 veces. Inmediatamente se transfirió el contenido a tubos eppendorf estériles a partir de los cuales se realizaron diluciones seriales (1:10, 1:100 y 1:1,000) en PBS 1X estéril. Se plaquearon 10 µl de cada dilución y de la solución directa sobre cajas Petri con LB conteniendo 100 µg/ml de estreptomina (5 repeticiones para obtener un promedio). Los inóculos iniciales también fueron diluidos de manera serial y se sembraron como se describió anteriormente. Las cajas se incubaron a 37°C y al siguiente día se contaron las colonias obtenidas. Los cálculos de las UFCs/ml se hicieron tomando en cuenta los factores de dilución.

La línea celular de fibroblastos NRK-49F de rata (ATCC CRL-1570) se creció en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, como se ha descrito previamente (Aiastrui *et al.*, 2010). Para el ensayo de invasión, se pusieron inóculos a partir de una colonia bacteriana en 2 ml de LB y se crecieron durante toda la noche a 37°C en condiciones estáticas y sin aireación hasta una D.O._{600nm} final de ~1. La monocapa de células se infectó por 10 min usando una MOI de 10:1, como se ha descrito previamente (Aiastrui *et al.*, 2010). Después de lavados extensivos, los fibroblastos fueron incubados con medio fresco conteniendo 100 µg/ml de gentamicina hasta las 2 h post-infección. Transcurrido ese tiempo, los fibroblastos fueron lisados con una solución de Tritón

X-100 1% en PBS 1X pH 7.4 estéril. El número de bacterias intracelulares viables se determinó igual que en el caso de células HeLa y macrófagos.

8.16. Ensayo de replicación/sobrevivencia en células epiteliales HeLa y macrófagos

Se siguió la misma metodología que para el ensayo de invasión a células HeLa y macrófagos, hasta la hora de incubación con gentamicina (50 µg/ml). Transcurrida esa hora, se removió el medio y se sustituyó por DMEM con 10 µg/ml de gentamicina. De inmediato se incubó a 37°C, 5% CO₂ durante el tiempo faltante para las 4, 8 y 16 h post-infección (tiempos de replicación). Al cumplirse los tiempos indicados, se lisó, plaqueó y contaron las UFCs/ml de igual manera que para el ensayo de invasión. Las veces de replicación se calcularon dividiendo las UFCs/ml (4, 8 y 16 h) entre las UFCs/ml (1 h [invasión]).

8.17. Ensayo de adherencia a células HeLa

Se prepararon las monocapas de células HeLa en las placas de 24 pozos y los cultivos bacterianos de la misma manera que para el ensayo de invasión a células HeLa. Una vez que las bacterias alcanzaron la D.O. deseada, se centrifugó 1 ml de cultivo durante 2 min a 8,000 x g. Enseguida se removieron cuidadosamente 900 µl del sobrenadante sin deshacer la pastilla de bacterias. Después se resuspendieron las pastillas en 900 µl de PBS 1X estéril. Posteriormente, cada pozo conteniendo las monocapas de células HeLa en cultivo se infectaron con 10 µl de la solución de bacterias anterior y se movió la placa para mezclar (este fue el tiempo 0). Enseguida se incubó la placa a 37°C, 5% CO₂ durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, se retiró el DMEM de cada uno de los pozos y se lavaron las monocapas de células 4 veces adicionando 1 ml de PBS 1X estéril a cada pozo, agitando cuidadosamente la placa y retirando el PBS. Una vez removido el PBS se solubilizaron las monocapas de células, se realizaron diluciones seriales, se plaqueó y al siguiente día se contaron las UFCs/ml de igual manera que para el ensayo de invasión.

8.18. Experimentos de infección en ratones

La manipulación de los animales en este trabajo se llevó a cabo de acuerdo a los protocolos estandarizados aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de CICUAL-UNAM, y por la Norma Oficial Mexicana NOM-062Z00-1999. Ratones BALB/c libres de patógenos (6 a 7 semanas de nacidos) fueron obtenidos de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM. Se mantuvieron cuatro grupos de cuatro animales en diferentes cajas separadas. Se les retiró el agua y alimento 4 h antes del tratamiento de los ratones con 50 mg de estreptomina por administración orogástrica; luego se les proporcionó a los animales agua y comida *ad libitum*. Para la infección, cultivos de toda la noche de las cepas de *Salmonella* se diluyeron 1:100 en 5 ml de LB fresco y se incubaron a 37°C con agitación durante 3 h. Después de 24 h del tratamiento con estreptomina, nuevamente se les retiró el agua y alimentos 4 h antes de la infección de los ratones con 50 µl de una suspensión de bacterias de 1×10^8 UFCs/ml en PBS 1X, o de la administración de 50 µl de PBS 1X estéril (control). Posteriormente, se les proporcionó a los animales agua y comida *ad libitum*.

Para analizar el efecto de la ausencia del gen *grhD1*, a las 48 h post-infección, los animales fueron eutanizados con una sobredosis de los anestésicos Ketamina y Xilacina administrados vía intraperitoneal, en una campana de trabajo (Thermo-Scientific). Se removieron de manera aséptica el bazo, ciego e íleon terminal, se pesaron y homogeneizaron en 1 ml de PBS 1X frío y estéril. Para evaluar la infiltración de neutrófilos, se analizaron muestras del contenido del ciego por microscopia para determinar el número de neutrófilos y el total de células eucariotes de 15 diferentes campos, usando el método de tinción Diff-Quick y un microscopio invertido Nikon TE300 (objetivo 60X). Para analizar la colonización bacteriana, se agregó Tritón X-100 al 2% a los órganos homogeneizados y se determinaron las UFCs plaqueando diluciones seriales de los lisados obtenidos en cajas de LB conteniendo 100 µg/ml de estreptomina.

Para analizar el efecto de la ausencia del gen *grhD2*, a las 48 h post-infección se colectaron muestras de heces de cada ratón, se pesaron y homogeneizaron en 1 ml de PBS 1X frío y estéril, y se determinó el número de UFCs/g de heces plaqueando diluciones seriales en cajas de LB conteniendo 100 µg/ml de estreptomina.

8.19. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados usando el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía con la prueba de comparación múltiple Tukey. Los valores de $P < 0.05$ fueron considerados significativos. Todos los análisis se realizaron usando el programa Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA).

9. RESULTADOS

9.1. Regulación y papel en virulencia del gen *grhD1* (SL1872)

9.1.1. HiID regula positivamente la expresión de *grhD1* en medio LB

Para la caracterización de la regulación del gen *grhD1* mediada por HiID, primero se confirmó que la expresión de GrhD1-FLAG es controlada por HiID mediante la complementación de la cepa mutante $\Delta hilD$ con el plásmido pK6-HiID, el cual expresa a HiID a partir de un promotor inducible por arabinosa. Para esto, se obtuvieron extractos de proteína total de muestras de cultivos de las cepas de *S. Typhimurium* SL1344 WT y la mutante isogénica $\Delta hilD$ conteniendo o no el plásmido pK6-HiID o el vector pMPM-K6 Ω , crecidas en medio LB a 37°C, condición que favorece la expresión de los genes de SPI-1, los cuales fueron analizados por Western blot utilizando anticuerpos anti-FLAG. Como se esperaba, se detectó que la expresión de GrhD1-FLAG disminuyó drásticamente en la mutante $\Delta hilD$ y que el plásmido pK6-HiID, que expresa a HiID, restauró la expresión de GrhD1-FLAG en la mutante $\Delta hilD$ al nivel de la cepa WT, no así el vector pMPM-K6 Ω (Figura 9). En conjunto con los datos obtenidos previamente en nuestro grupo, estos resultados demuestran que HiID controla positivamente la expresión de *grhD1*.

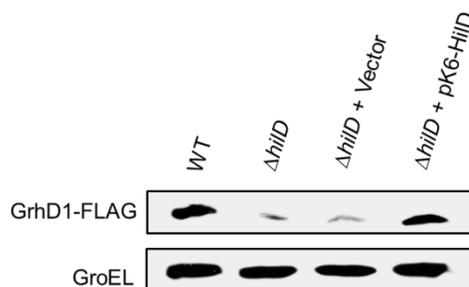


Figura 9. HiID regula positivamente la expresión de GrhD1. Expresión de GrhD1-FLAG en la cepa WT de *S. Typhimurium* y su mutante derivativa $\Delta hilD$ conteniendo o no el plásmido pK6-HiID, que expresa a HiID a partir de un promotor inducible por arabinosa, o conteniendo el vector pMPM-K6 Ω . La expresión de GrhD1-FLAG fue analizada a partir de lisados celulares totales de muestras de cultivos bacterianos crecidos en LB a 37°C por Western blot usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control de carga, se determinó la expresión de GroEL usando anticuerpos policlonales anti-GroEL. Como control de carga, se determinó la expresión de GroEL usando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

Una vez mostrado que HilD controla la expresión de *grhD1*, se investigó si esta regulación es directa o indirecta. Para esto, la proteína purificada MBP-HilD y el fragmento de DNA de la región intergénica corriente arriba de *grhD1* fue usada para realizar ensayos de retardo en gel (EMSA). Como controles positivo y negativo se utilizaron fragmentos de DNA de la región reguladora de *hilA* y *sigD*, respectivamente. Como se esperaba, la proteína MBP-HilD se unió específicamente al fragmento de *hilA* a concentraciones de 0.5 a 1 μM (Figura 10B); en contraste, a las mismas concentraciones no se unió al fragmento de *grhD1*, o al del control negativo, *sigD* (Figura 10A y B). Estos resultados indican que HilD regula a *grhD1* indirectamente; o que se requiere de un factor adicional para que HilD se una a *grhD1*. Previamente se ha reportado una secuencia consenso de unión de HilD, al realizar una búsqueda de esta secuencia en la región intergénica corriente arriba de *grhD1* no se identificaron sitios de unión para HilD, lo cual apoya a que HilD regula de manera indirecta la expresión de *grhD1*.

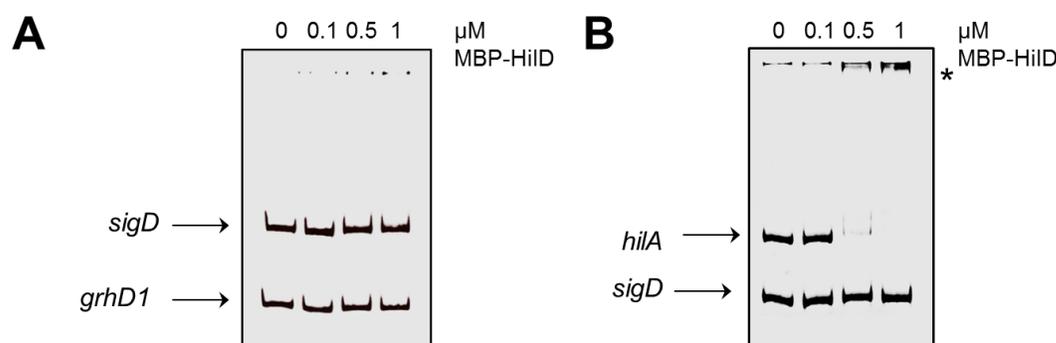


Figura 10. HilD no se une a la región reguladora de *grhD1*. EMSAs con la proteína purificada MBP-HilD (0, 0.1, 0.5 y 1 μM) y fragmentos de DNA que contienen la región reguladora de *grhD1* (A) y *hilA* (B). Estos fragmentos de DNA corresponden a los contenidos en las fusiones transcripcionales *grhD1-cat* y *hilA-cat*. Un fragmento de DNA conteniendo la región reguladora de *sigD* fue usado como control negativo. Los complejos DNA-proteína, indicados por un asterisco, fueron analizados en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes al 6% teñidos con bromuro de etidio.

HilD induce la expresión de varios reguladores transcripcionales, incluyendo HilC, HilA e InvF, codificados en SPI-1, así como de RtsA, SsrB y FlhDC, codificados fuera de SPI-1 (Fabrega and Vila, 2013; Singer *et al.*, 2014). Para investigar si HilD regula a *grhD1* a través de alguno de estos reguladores, la actividad de la fusión *grhD1-cat* se determinó en la cepa WT de *S. Typhimurium* y la doble mutante $\Delta\text{SPI-1 } \Delta\text{rtsA}$ conteniendo o no el vector pMPM-k6 Ω o el

plásmido pK6-HilD, así como en las mutantes $\Delta ssrB$, $\Delta flhDC$, $\Delta hilA$, y $\Delta invF$, crecidas en LB. Como se esperaba, la expresión de la fusión *grhD1-cat* disminuyó dos veces en la mutante $\Delta SPI-1 \Delta rtsA$, debido a la ausencia de HilD; sin embargo, su expresión se restauró a los niveles de la cepa WT en presencia del plásmido pK6-HilD (Figura 11A). Por otro lado, la fusión *grhD1-cat* mostró un nivel de expresión similar en la cepa WT y las mutantes $\Delta ssrB$, $\Delta flhDC$, $\Delta hilA$, y $\Delta invF$ (Figura 11B). Estos resultados indican que en las condiciones probadas HilD no requiere de otro regulador codificado en SPI-1 (HilC, HilA, InvF, SprB), o de RtsA, SsrB o FlhDC, para regular la expresión de *grhD1*.

En conjunto, estos resultados muestran que HilD controla indirectamente la expresión de *grhD1*, a través de un regulador no conocido que es regulado por HilD y que se encuentra en *S. Typhimurium*.

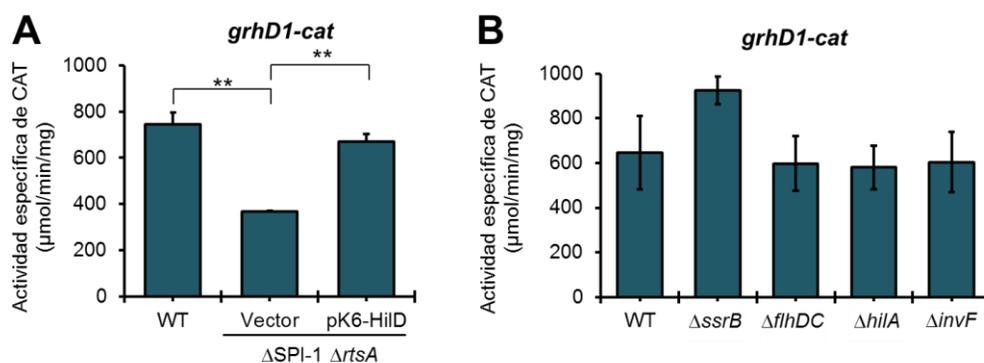


Figura 11. La expresión de *grhD1* mediada por HilD no requiere de otro regulador codificado en SPI-1, o de RtsA, SsrB o FlhDC. La expresión de la fusión transcripcional *grhD1-cat* contenida en el plásmido pgrhD1-cat fue analizada en la cepa de *S. Typhimurium* WT y su mutante isogénica $\Delta SPI-1 \Delta rtsA$ conteniendo el plásmido pK6-HilD, que expresa a HilD a partir de un promotor inducible por arabinosa, o el vector pMPM-K6 Ω (A), así como en la cepa de *S. Typhimurium* WT y sus mutantes isogénicas $\Delta ssrB$, $\Delta flhDC$, $\Delta hilA$ y $\Delta invF$ (B). Se determinó la actividad específica de CAT a partir de muestras de cultivos bacterianos crecidos en medio LB a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (**, $p < 0.01$).

9.1.2. PhoP regula positivamente la expresión de *grhD1* en medio LB y medio mínimo

Previamente se reportó que el regulador de respuesta PhoP regula de manera positiva y directa la expresión del operón que contiene a los genes *ecgA* y *SL1874*, los cuales están localizados corriente arriba de *grhD1*, en la misma isla genómica de *S. Typhimurium* (Figura 7) (Rico-Pérez *et al.*, 2016). Por lo tanto, investigamos si PhoP podría estar involucrado en la expresión de *grhD1*, lo cual también está respaldado por un análisis transcriptómico reciente (Colgan *et al.*, 2016). Para determinar esto, se examinó la actividad de la fusión *grhD1-cat* en la cepa WT de *S. Typhimurium* y la mutante Δ *phoP*, crecidas en LB y medio MM-N. Se conoce que PhoP es activo cuando *S. Typhimurium* crece en LB o en medios mínimos con bajas concentraciones de magnesio (Rico-Pérez *et al.*, 2016). Como controles positivo y negativo, se incluyeron los ensayos de las expresiones de las fusiones transcripcionales a *cat* de los genes *pagK*, un gen regulado positivamente por PhoP, y del gen *sirA*, un gen que no es regulado por PhoP. La actividad de las fusiones *grhD1-cat*, *pagK-cat* y *sirA-cat* fue mayor en medio MM-N que en LB; sin embargo, el patrón de expresión de cada fusión en los diferentes fondos genéticos fue el mismo en ambas condiciones de crecimiento (Figura 12). La actividad de las fusiones *grhD1-cat* y *pagK-cat* disminuyó en la mutante Δ *phoP* con respecto a la cepa WT; la expresión de PhoP a partir del plásmido pK3-PhoP recuperó la actividad de ambas fusiones a niveles de la cepa WT, no así en presencia del vector pMPM-K3 (Figura 12A, B, D y E). En contraste, la actividad de la fusión *sirA-cat* no se afectó por la ausencia o la sobre-expresión PhoP (Figura 12C y F).

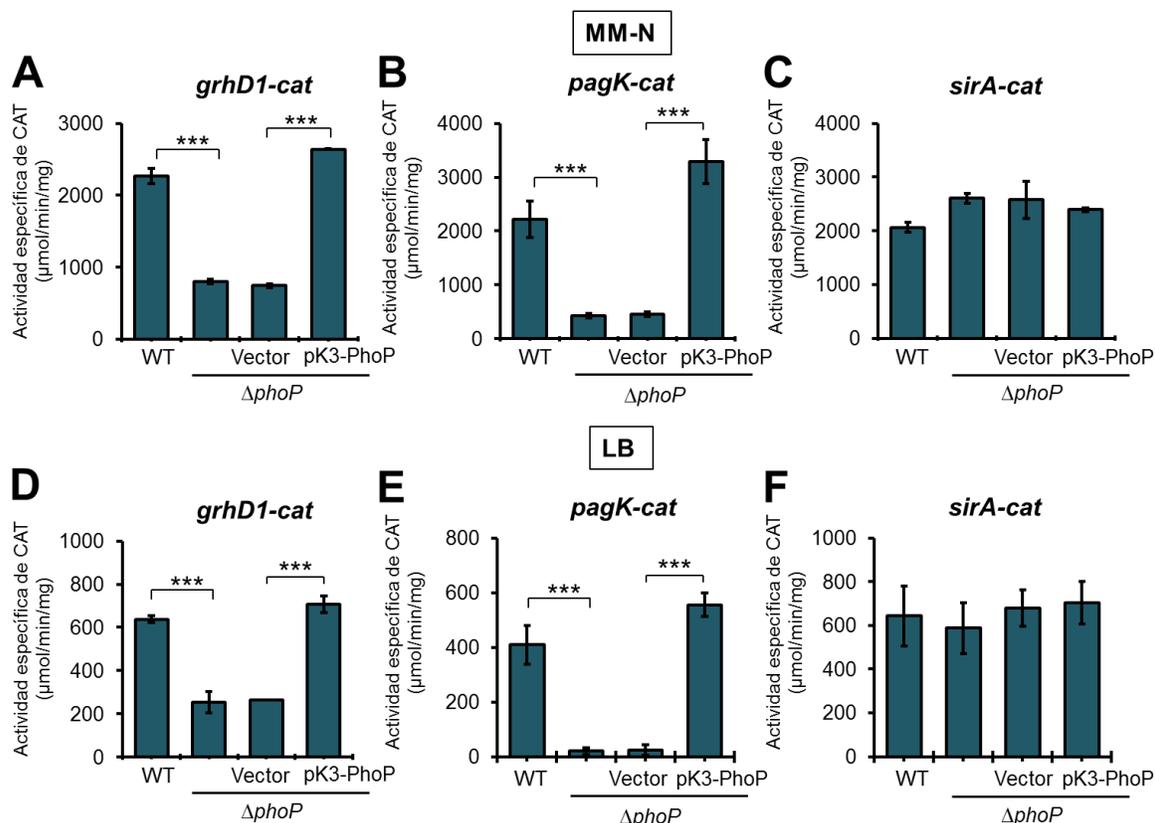


Figura 12. PhoP activa la expresión de *grhD1*. La expresión de las fusiones transcripcionales *grhD1-cat* (A, D), *pagK-cat* (B, E) y *sirA-cat* (C, F), contenidas en los plásmidos p*grhD1-cat*, p*pagK-cat* y p*sirA-cat*, respectivamente, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y su mutante isogénica $\Delta phoP$ conteniendo o no el vector pMPPM-K3 o el plásmido pK3-PhoP, crecidas en medio LB (A-C) o medio MM-N (D-F) a 37°C. Los datos de la actividad específica de CAT son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (***, $p < 0.001$).

Para corroborar estos resultados, se evaluó la expresión de la proteína GrhD1-FLAG en la cepa WT y la mutante $\Delta phoP$ conteniendo o no el vector pMPPM-K3 o el plásmido pK3-PhoP en medio LB, así como en medio ISM (intracellular salt medium) o medio PCN (phosphate-carbon-nitrogen) acidificado. En todas las condiciones ensayadas, la expresión de GrhD1 se redujo drásticamente en la mutante $\Delta phoP$ con respecto a la cepa WT (Figura 13A y B). Como se esperaba, la presencia del plásmido pK3-PhoP, pero no del vector pMPPM-K3, restauró la expresión de GrhD1 en la mutante $\Delta phoP$ al nivel de la cepa WT (Figura 13B). Estos resultados indican que PhoP controla positivamente la

expresión de *grhD1* cuando *S. Typhimurium* crece en medio LB o en medio mínimo.

Adicionalmente, para determinar si otros reguladores de genes de virulencia en *Salmonella* que se ha reportado están activos tanto en medio LB y medios mínimos, están involucrados en la expresión de GrhD1, se determinó la expresión de GrhD1-FLAG en las mutantes $\Delta ompR$ y $\Delta slyA$, en los medios LB, ISM o PCN acidificado. En medio PCN la expresión de GrhD1-FLAG disminuyó en la mutante $\Delta ompR$ en comparación con la cepa WT y no se afectó en medio LB e ISM. En contraste, en todas las condiciones probadas la expresión de GrhD1-FLAG se redujo en la mutante $\Delta slyA$ con respecto a la cepa WT (Figura 13A). Estos resultados indican que OmpR puede regular la expresión de GrhD1 en medio mínimo ácido, y que SlyA, al igual que PhoP, también está involucrado en la activación de la expresión de GrhD1 en medio rico y mínimo, esto último concuerda con resultados obtenidos por métodos transcriptómicos (Colgan *et al.*, 2016).

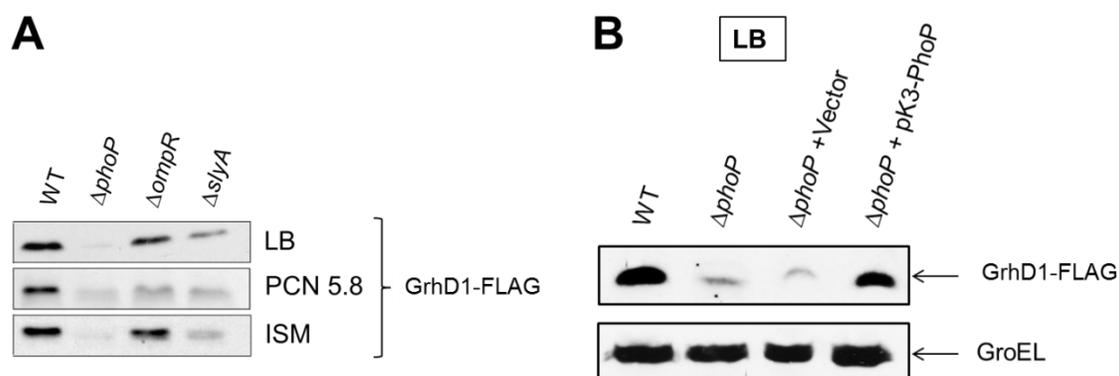


Figura 13. PhoP y SlyA regulan positivamente la expresión de GrhD1 en diferentes condiciones de crecimiento. La expresión de GrhD1-FLAG fue evaluada en la cepa de *S. typhimurium* WT y sus mutantes isogénicas $\Delta phoP$, $\Delta ompR$ y $\Delta slyA$ crecidas en medio LB, PCN acidificado o ISM a 37°C (A). Adicionalmente, también se evaluó en la cepa de *S. Typhimurium* WT y su mutante isogénica $\Delta phoP$ conteniendo o no el plásmido pK3-PhoP que expresa constitutivamente a PhoP, o el vector pMPPM-K3 (B). Se prepararon lisados celulares totales de muestras de cultivos bacterianos y se analizaron por Western blot usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control de carga, se determinó la expresión de GroEL usando anticuerpos policlonales anti-GroEL. Como control de carga, se determinó la expresión de GroEL usando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

Para determinar si PhoP regula a *grhD1* directa o indirectamente, se realizaron EMSAs con la proteína purificada PhoP-6XHis (PhoP-H6) fosforilada y un fragmento de DNA marcado radioactivamente que contenía la región reguladora de *grhD1*. Fragmentos de DNA que contenían la región reguladora de los genes *orgB* o *ges* fueron utilizados como control positivo y negativo, respectivamente. PhoP-H6 se unió a los fragmentos *grhD1* y *orgB* desde una concentración de 3 μM . En contraste, PhoP-H6 no se unió al fragmento de *ges* incluso a una concentración de 6 μM (Figura 14A). La unión específica de PhoP-H6 a *grhD1* se confirmó mediante EMSAs competitivos (Figura 14B). En conjunto con los análisis de expresión, estos resultados demuestran que PhoP regula de manera directa la expresión del gen *grhD1*. Cabe mencionar que al realizar una búsqueda en la región intergénica corriente arriba de *grhD1* de la secuencia consenso de unión de PhoP que se ha reportado, no se identificaron sitios de unión para PhoP con base en esa secuencia; sin embargo, se han reportado otros blancos directos de PhoP donde no se ha localizado esa secuencia, lo que sugiere que PhoP estaría reconociendo otros sitios.

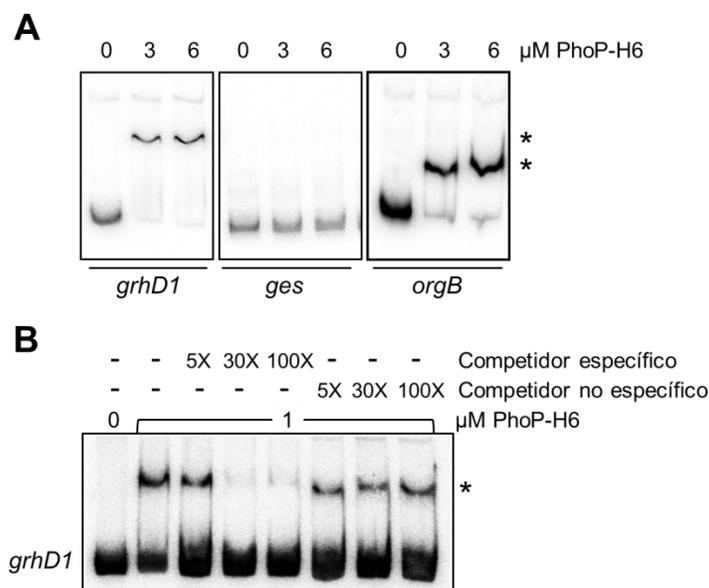


Figura 14. PhoP se une específicamente a la región reguladora de *grhD1*. EMSAs con la proteína purificada PhoP y fragmentos de DNA conteniendo la región reguladora de los genes *grhD1*, *ges* y *orgB* (A). Fragmentos de DNA marcados en su extremo 5' con ^{32}P de cada gen fueron incubados con concentraciones crecientes de PhoP-H6 (0, 3 y 6 μM). Los genes *ges* y *orgB* fueron usados como control negativo y positivo, respectivamente. La unión de PhoP a *grhD1* se confirmó con EMSAs competitivos (B). El fragmento de DNA de *grhD1* marcado en su extremo 5' con ^{32}P se

incubó con 1 μ M de PhoP-H6 fosforilada en ausencia o presencia de un exceso de 5, 30 y 100 veces de un competidor específico (*grhD1*) y no específico (*nusA*) no marcados. Los complejos DNA-proteína, indicados por un asterisco, fueron analizados en geles de poliacrilamida Tris-borato-EDTA no desnaturizantes al 8%. Después de la electroforesis, los geles fueron secados y analizados en un escáner láser Typhoon FLA 7000 IP.

9.1.3. HilD regula positiva e indirectamente la expresión de *phoP* en medio LB

Con base en nuestros resultados, sabemos que se requiere de ambos, HilD y PhoP, para la expresión del gen *grhD1* en medio LB. Más aún, en nuestro grupo se ha encontrado que existe un solapamiento entre los regulones de HilD y PhoP, donde HilD está involucrado en la expresión de varios genes regulados por PhoP (Pérez-Morales, D., datos no publicados). Así, podría ser que estos dos reguladores actuaran uno a través del otro para inducir la expresión del gen *grhD1*. Por esta razón se evaluó si HilD podría estar regulando a PhoP o viceversa, PhoP a HilD. Para esto, se construyó la fusión transcripcional *phoP-cat* y se determinó su expresión en las cepas de *S. Typhimurium* WT y su derivada mutante Δ *hilD*, crecidas en medio LB a 37°C. La expresión de la fusión *phoP-cat* disminuyó alrededor de 2 veces en la mutante Δ *hilD* (Figura 15A). En contraste, el nivel de expresión de una fusión *hilD-cat* fue similar en la cepa de *S. Typhimurium* WT y en su derivada mutante Δ *phoP* (Figura 15C). Estos resultados indican que HilD regula positivamente la expresión de PhoP, pero no al contrario. Para corroborar estos resultados, se transformó la cepa Δ *hilD* que contiene la fusión *phoP-cat* con el vector pMPM-K6 Ω o el plásmido pK6-HilD. La presencia del plásmido pK6-HilD incrementó la expresión de la fusión *phoP-cat* en la mutante Δ *hilD*, a un nivel incluso mayor que el mostrado en la cepa WT (Figura 15A), lo cual corrobora que HilD regula de manera positiva a PhoP.

E. coli K-12 carece de *hilD*, así como de alrededor de otros 1400 genes presentes en *S. Typhimurium*. La expresión de genes que son regulados directamente por HilD, como *hilA*, puede ser inducida en *E. coli* K-12 cuando HilD está presente (Martínez-Flores *et al.*, 2016). Entonces, para determinar si HilD está regulando directamente la expresión de *phoP* o lo hace a través de otro regulador de *S. Typhimurium*, analizamos la expresión de la fusión *phoP-cat* en la cepa de *E. coli* MC4100 WT conteniendo al vector pMPM-K6 Ω o el plásmido pK6-HilD. La presencia del plásmido pK6-HilD no incrementó la expresión de la fusión

phoP-cat en *E. coli* (Figura 15B), sugiriendo que HilD regula la expresión de *phoP* de forma indirecta, a través de un regulador presente en *S. Typhimurium* y no en *E. coli*. En apoyo a este resultado, mediante EMSAs, utilizando un fragmento de DNA que contiene la región reguladora de *phoP* y la proteína purificada MBP-HilD, comprobamos que HilD no se une a la región reguladora de *phoP*, ni a la del control negativo, *sigD* (Figura 15D). MBP-HilD sí se unió a la región reguladora de *hilA*, el cual fue utilizado como control positivo (Figura 15E). Estos datos muestran que HilD regula positiva e indirectamente la expresión de *phoP*. Así, es posible que HilD induzca de manera indirecta a través de PhoP la expresión de varios genes, incluyendo a *grhD1*.

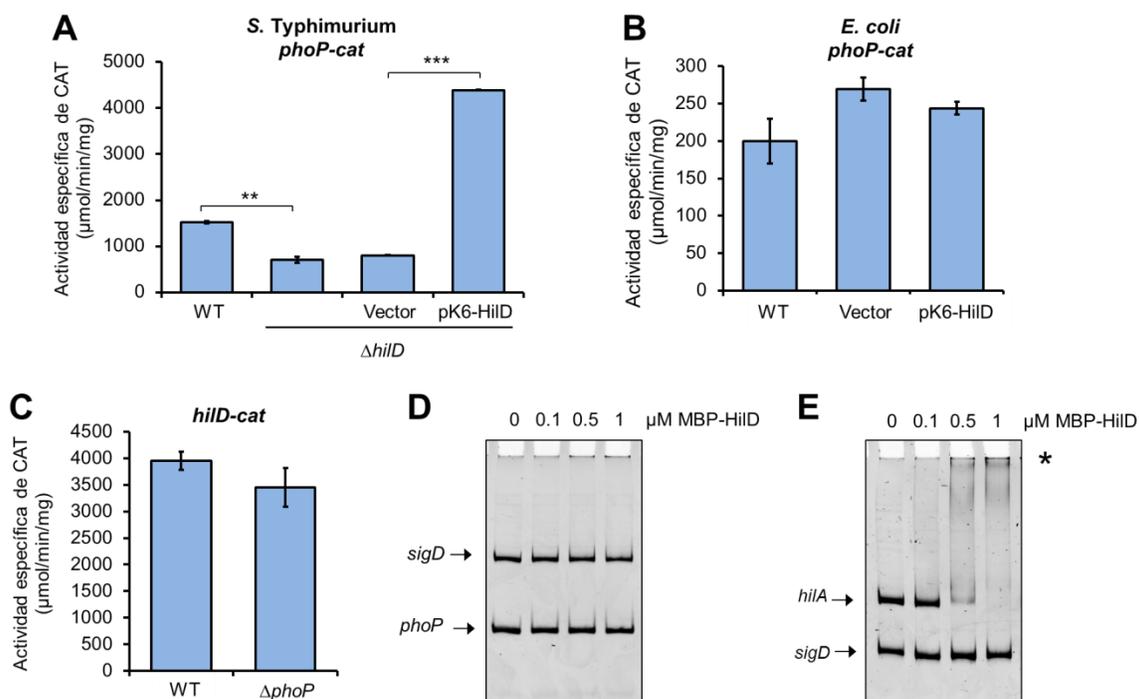


Figura 15. HilD regula de forma indirecta la expresión de *phoP*. La expresión de la fusión transcripcional *phoP-cat*, contenida en el plásmido pphoP-cat, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y su derivada mutante ΔhilD , conteniendo o no el vector pMPM-K6 o el plásmido pK6-HilD (A), así como en la cepa WT de *E. coli* MC4100 conteniendo o no el vector pMPM-K6 o el plásmido pK6-HilD (B). Asimismo, la expresión de la fusión transcripcional *hilD-cat*, contenida en el plásmido philD-cat, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y su derivada mutante ΔphoP (C). La expresión de HilD a partir del plásmido pK6-HilD fue inducida con 0.001% de L-arabinosa. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 9 h en medio LB a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las

desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Se llevaron a cabo EMSAs con la región reguladora de *phoP* (D) o *hilA* (E), con concentraciones crecientes de la proteína purificada MBP-HilD. Se usó un fragmento de la región reguladora de *sigD* negativo interno en todas las reacciones. Los complejos DNA-proteína fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con bromuro de etidio.

9.1.4. HilD y PhoP controlan independientemente la expresión de *grhD1*

Nuestros resultados indican que HilD y PhoP controlan positivamente la expresión de *grhD1*, los cuales pueden actuar de manera independiente o uno a través del otro; por ejemplo, como HilD regula indirectamente a *phoP* y *grhD1*, este podría actuar a través de PhoP para regular a *grhD1*. Para investigar esto, primero se comparó la actividad de la fusión *grhD1-cat* en las cepas de *S. Typhimurium* WT y las mutantes $\Delta hilD$, $\Delta phoP$ y $\Delta phoP \Delta hilD$, crecidas en LB o MM-N. En LB, la fusión *grhD1-cat* mostró una reducción de dos veces su actividad en las mutantes $\Delta hilD$ o $\Delta phoP$, con respecto a la cepa WT, mientras que en la doble mutante $\Delta phoP \Delta hilD$ su actividad fue cuatro veces más baja que en las mutantes sencillas (Figura 16A), indicando que HilD y PhoP tienen un efecto aditivo sobre *grhD1*. En contraste, en medio MM-N la actividad de la fusión *grhD1-cat* no se afectó en la mutante $\Delta hilD$ y mostró una disminución de 2.5 veces en las mutantes $\Delta phoP$ y $\Delta phoP \Delta hilD$ (Figura 16B), mostrando que PhoP regula a *grhD1* independientemente de HilD en esta condición de crecimiento. Posteriormente, determinamos la actividad de la fusión *grhD1-cat* en la doble mutante $\Delta phoP \Delta hilD$ conteniendo el vector pMPM-K3 o los plásmidos pK3-PhoP, pK6-HilD o pK3-SirA, que expresan a PhoP, HilD y SirA, respectivamente, en medio LB. SirA es un regulador transcripcional que no está involucrado en la expresión de *grhD1*. La expresión de PhoP o HilD, no así de SirA, indujo la actividad de la fusión *grhD1-cat* en la doble mutante $\Delta phoP \Delta hilD$ (Figura 16C). En conjunto, estos resultados muestran que PhoP y HilD regulan de forma independiente a *grhD1*; interesantemente, la sobre-expresión de uno de estos reguladores compensa la ausencia del otro para la expresión de *grhD1*.

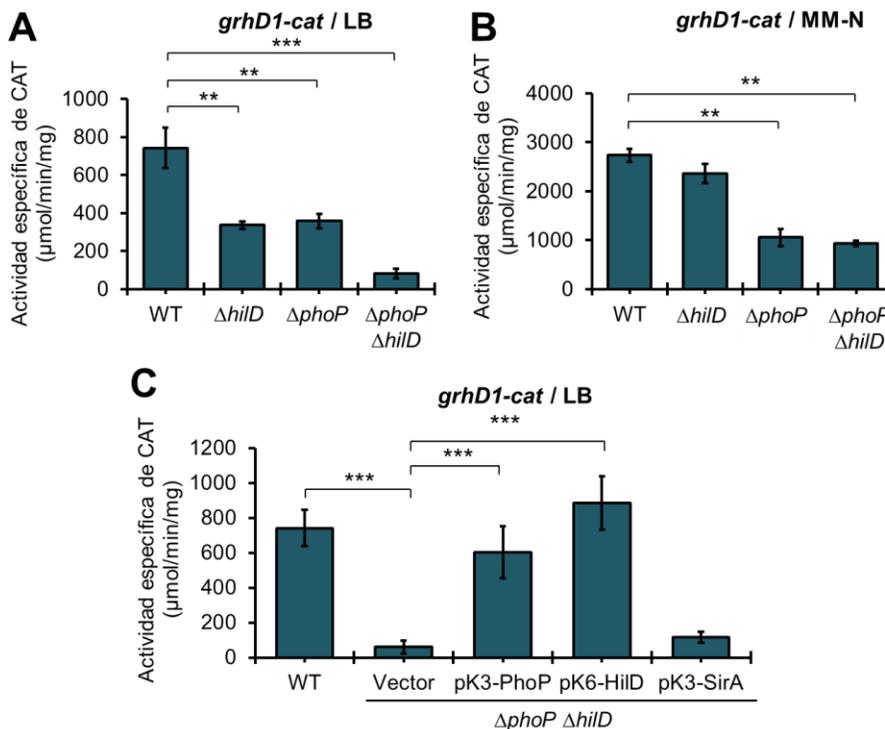


Figura 16. HiID y PhoP inducen la expresión de *grhD1* en medio LB de manera independiente. La expresión de la fusión transcripcional *grhD1-cat*, contenida en el plásmido p*grhD1-cat*, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y sus derivadas mutantes $\Delta hilD$, $\Delta phoP$ y $\Delta phoP \Delta hilD$, crecidas en LB (A) o medio mínimo MM-N (B) a 37°C. Asimismo, se determinó la expresión de la fusión *grhD1-cat* en la cepa WT y en la doble mutante $\Delta phoP \Delta hilD$ conteniendo el vector pMPM-K3, o los plásmidos pK3-PhoP, pK6-HilD o pK3-SirA, crecidas a 37°C (C). La expresión de HiID a partir del plásmido pK6-HilD fue inducida con 0.001% de L-arabinosa. pK3-PhoP y pK3-SirA expresan constitutivamente a PhoP y SirA, respectivamente, a partir de un promotor *lac*. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (*, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Un análisis previo de RNA-seq reveló un sitio de inicio de la transcripción (SIT) primario y otro secundario en la región intergénica corriente arriba de *grhD1*, localizados a 230 y 148 pb del codón de inicio de *grhD1*, respectivamente (Figura 17A) (Kröger *et al.*, 2013). La fusión *grhD1-cat* utilizada en los experimentos descritos anteriormente abarca la región del DNA que contiene los dos SITs. Por lo tanto, para definir si la expresión de *grhD1* está mediada por dos promotores, y si ese es el caso, determinar si HiID y PhoP afectan a uno o a ambos promotores, se construyeron tres fusiones transcripcionales de *grhD1-cat* adicionales. La fusión *grhD1L-cat* tiene el extremo 3' extendido de la región corriente arriba de *grhD1* con

respecto a la región contenida en la fusión inicial *grhD1-cat*, mientras que las fusiones *grhD1+1p-cat* y *grhD1+1s-cat* contienen segmentos de la región corriente arriba de *grhD1* que contienen solo el SIT primario o secundario, respectivamente (Figura 17A). La actividad de estas nuevas fusiones fue monitoreada en la cepa WT de *S. Typhimurium* así como en la doble mutante $\Delta phoP \Delta hilD$, crecidas en LB. Las fusiones *grhD1L-cat*, *grhD1+1p-cat* y *grhD1+1s-cat* se expresaron a niveles similares en la cepa WT (Figura 17B-D). En conjunto con el reporte de RNA-seq que indica dos SIT corriente arriba de *grhD1* (Kröger *et al.*, 2013), estos resultados muestran que dos promotores independientes controlan la expresión de *grhD1* en las condiciones de crecimiento probadas. La fusión *grhD1L-cat*, que contiene ambos promotores, mostró una reducción de 17 veces de su actividad en la mutante $\Delta phoP \Delta hilD$, la cual fue restaurada a niveles de la cepa WT por la expresión de PhoP o HilD a partir de los plásmidos pK3-PhoP o pK6-HilD, respectivamente (Figura 17B). Estos resultados en conjunto con los mostrados en la Figura 16C, muestran que HilD y PhoP pueden inducir de manera independiente la transcripción de los dos promotores de *grhD1*. Sorpresivamente, la actividad de las fusiones *grhD1+1p-cat* y *grhD1+1s-cat* no se vio afectada significativamente en la mutante $\Delta phoP \Delta hilD$ conteniendo o no el plásmido pK3-PhoP con respecto a los niveles de expresión de la cepa WT; solo la presencia del plásmido pK6-HilD incrementó la actividad de estas fusiones (Figura 17C y D). Estos resultados sugieren que el control apropiado de la expresión de *grhD1* requiere de secuencias de regulación negativa localizadas alrededor de los promotores; en ausencia de estas secuencias la expresión de *grhD1* se vuelve independiente de HilD y PhoP.

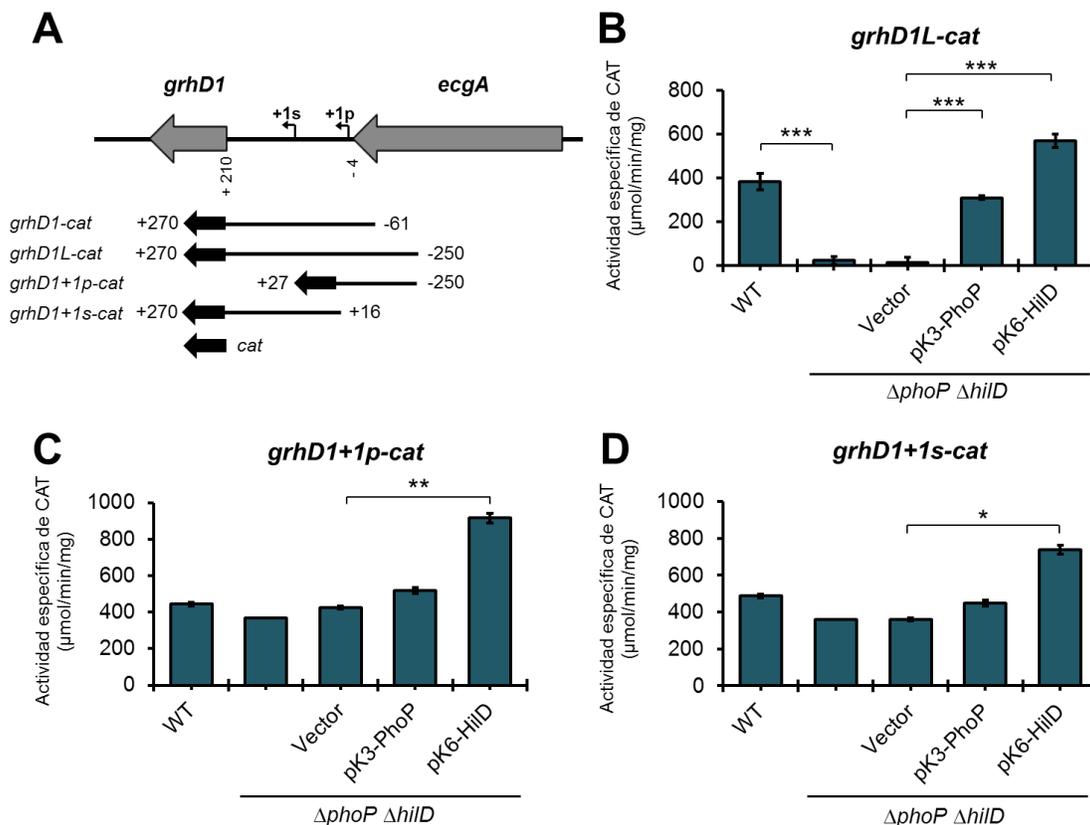


Figura 17. Dos diferentes promotores regulados por HiID y PhoP inducen la expresión de *grhD1*. Representación esquemática de la región intergénica corriente arriba de *grhD1* (A). El sitio de inicio de la transcripción primario (+1p) y secundario (+1s) de *grhD1*, previamente reportados (Kröger *et al.*, 2013), están indicados por una flecha doblada. Los fragmentos de DNA contenidos en las fusiones transcripcionales *grhD1-cat*, *grhD1L-cat*, *grhD1+1p-cat* y *grhD1+1s-cat* son mostrados; las posiciones son indicadas con respecto al sitio de inicio de la transcripción primario de *grhD1*. La expresión de las fusiones transcripcionales *grhD1L-cat* (B), *grhD1+1p-cat* (C), y *grhD1+1s-cat* (D), contenidas en pgrhD1L-cat, pgrhD1+1p-cat y pgrhD1+1s-cat, respectivamente, fueron analizadas en la cepa WT de *S. Typhimurium* y su mutante isogénica $\Delta phoP \Delta hilD$ conteniendo o no los plásmidos pK3-PhoP o pK6-HilD, o el vector pMPM-K3. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 9 h en LB a 37°C. La expresión de HiID a partir del plásmido pK6-HilD fue inducida al agregar 0.001% de L-arabinosa al medio al inicio del experimento. pK3-PhoP expresa constitutivamente a PhoP. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes con respecto a la cepa WT (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

9.1.5. H-NS reprime la expresión de *grhD1*

La proteína semejante a histona H-NS es un regulador transcripcional global que silencia la expresión de genes adquiridos por *Salmonella* (Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006). Por lo tanto, se investigó si las secuencias de regulación negativa en *grhD1* podrían mediar la represión por H-NS. Dado que las mutaciones nulas de *hns* generan un defecto severo en el crecimiento de *Salmonella* (Navarre *et al.*, 2006), se analizó el efecto de H-NS en *grhD1* sobre-expresando la mutante H-NS^{G113D}, que no tiene actividad de unión al DNA pero sí puede formar heterodímeros con monómeros de H-NS WT (Ueguchi *et al.*, 1996), actuando como una mutante dominante negativa (De la Cruz *et al.*, 2007). La actividad de la fusión *grhD1-cat* se determinó en las cepas mutantes Δ *hilD* y Δ *phoP* que contienen el plásmido pT6-HNS-G113D que expresa H-NS^{G113D}, así como en la cepa WT. La expresión de H-NS^{G113D} indujo la actividad de la fusión *grhD1-cat* en la mutante Δ *hilD*, no así en la mutante Δ *phoP* (Figura 18A). Estos resultados indican que al inactivar H-NS la expresión de *grhD1* se vuelve independiente de HilD, y revelan que H-NS reprime la expresión de *grhD1*.

Para determinar si H-NS regula directa o indirectamente a *grhD1*, se realizaron EMSAs con la proteína purificada H-NS-3XFLAG-6XHis (H-NS-FH) y un fragmento de DNA que contiene la región reguladora de *grhD1*. Se analizaron también fragmentos de DNA que contienen las regiones reguladoras de *sigD* y *ssrAB*, como control negativo y positivo, respectivamente. Se observó que H-NS-FH se une a la región reguladora de *grhD1* y de *ssrAB*, desde una concentración de 0.5 y 0.25 μ M, respectivamente; como se esperaba, H-NS-FH no se unió al control negativo *sigD* (Figura 18B y C). En conjunto con los resultados de análisis de expresión, estos resultados demuestran que H-NS reprime directamente la expresión de *grhD1* y que HilD quita esta represión mientras que PhoP actúa por otro mecanismo para activar la transcripción.

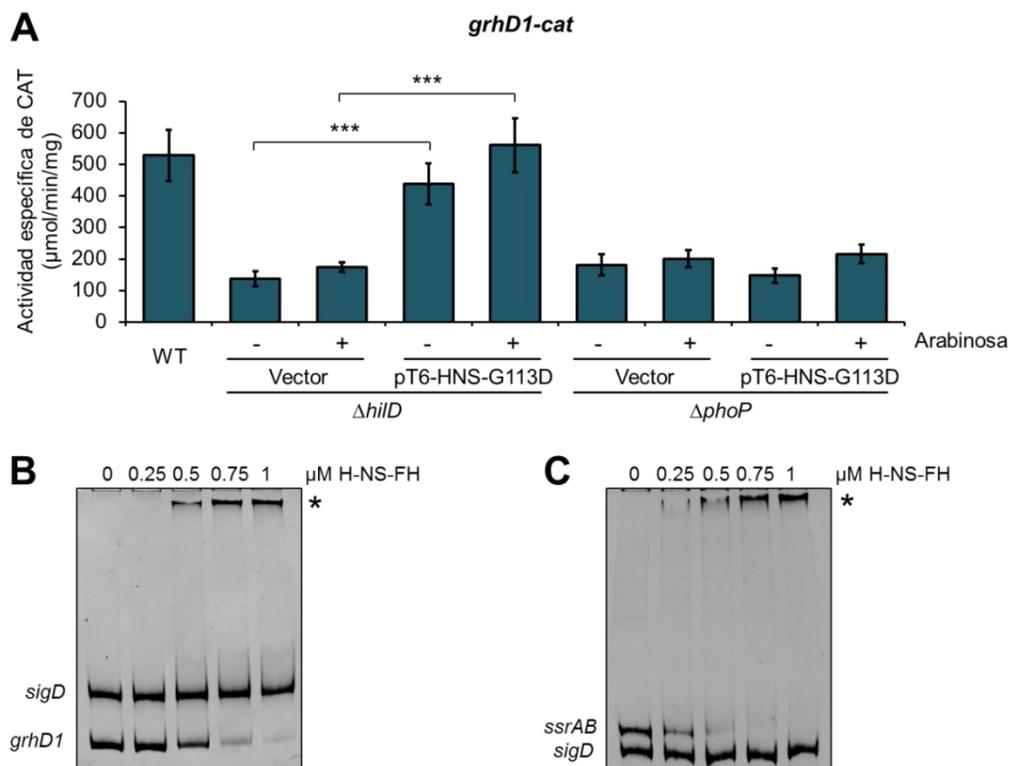


Figura 18. H-NS reprime directamente la expresión de *grhD1*. La expresión de la fusión transcripcional *grhD1-cat* (**A**) contenida en el plásmido p*grhD1-cat*, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y sus derivadas mutantes $\Delta hilD$ y $\Delta phoP$, conteniendo el vector pMPM-T6 Ω o el plásmido pT6-HNS-G113D, que expresa la mutante dominante negativa H-NS^{G113D}. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 9 h en medio LB a 37°C. 0.1% de L-arabinosa se agregó (+) o no (-) al medio para inducir la expresión de H-NS^{G113D} a partir del plásmido pT6-HNS-G113D. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (***, $p < 0.001$). EMSAs con la proteína purificada H-NS-FH (0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 μM) y fragmentos de DNA que contienen la región reguladora de los genes *grhD1* (**B**) o *ssrAB* (**C**). Un fragmento de DNA conteniendo la región reguladora de *sigD* se usó como control negativo interno. Los complejos DNA-proteína, indicados con un asterisco, fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con bromuro de etidio.

9.1.6. GrhD1 se requiere para la invasión de *S. Typhimurium* a células hospederas

HilD controla la expresión de un gran número de genes que se requieren principalmente para la invasión de *Salmonella* a células de su hospedero (Fabrega and Vila, 2013). Por lo tanto, investigamos si el gen *grhD1*, regulado por HilD, está

involucrado en este fenotipo de virulencia. Se utilizó un ensayo de protección a gentamicina para analizar la invasión de las bacterias de la cepa WT de *S. Typhimurium* y la mutante $\Delta grhD1$ a células HeLa y macrófagos de ratón RAW264.7. Las mutantes $\Delta hilD$ y $\Delta ssrB$ fueron utilizadas como control positivo y negativo, respectivamente. El número de UFCs intracelulares recuperadas a 1 h post-infección se consideró como el número de bacterias que invadieron. La mutante $\Delta grhD1$ mostró una reducción de 4 veces en el número de bacterias que invadió tanto a células HeLa como a macrófagos en comparación con la cepa WT (Figura 19A y B). Como se esperaba, la mutante $\Delta ssrB$ no estuvo afectada en el fenotipo de invasión mientras que la mutante $\Delta hilD$ fue incapaz de invadir células HeLa y macrófagos (Figura 19A y B). El defecto para invadir de la mutante $\Delta grhD1$ se observó también en fibroblastos NRK-49F (Figura 19C). En los ensayos de invasión se puede utilizar un paso de centrifugación para acelerar el contacto entre las bacterias y las células eucariotes, lo cual ayuda a superar la deficiencia en la invasión debida a un defecto en la movilidad. La mutante $\Delta grhD1$ mostró un fenotipo de invasión reducido en células HeLa en comparación con la cepa WT con y sin el paso de centrifugación (Figura 19 A y D), lo que sugiere que no está afectada en su movilidad. En contraste, la mutante $\Delta flhDC$, que carece de movilidad, recuperó notablemente su capacidad de invadir las células HeLa con el paso de centrifugación (Figura 19E).

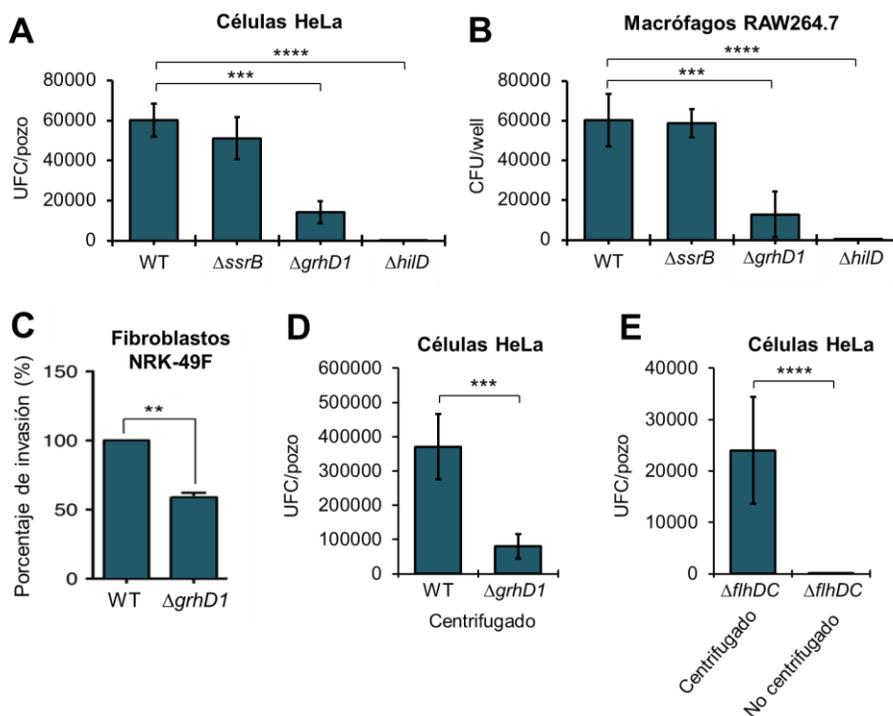


Figura 19. Se requiere de GrhD1 para la invasión de *S. Typhimurium* a células HeLa, macrófagos y fibroblastos. Se infectaron células HeLa **(A)** y macrófagos RAW264.7 **(B)** con la cepa WT de *S. Typhimurium* y sus mutantes isogénicas $\Delta ssrB$, $\Delta grhD1$ y $\Delta hilD$. Se infectaron fibroblastos NRK-49F **(C)** con la cepa WT de *S. Typhimurium* y su mutante isogénica $\Delta grhD1$. También se infectaron células HeLa con la cepa WT de *S. Typhimurium* y sus mutantes isogénicas $\Delta grhD1$ **(D)** y $\Delta filhDC$ **(E)**, con o sin centrifugación. El valor de invasión de cada cepa se obtuvo al contabilizar las UFCs intracelulares a 1 h post-infección, usando un ensayo de protección a la gentamicina. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

Posteriormente, se intentó complementar el fenotipo de invasión de la mutante $\Delta grhD1$ con un plásmido que expresara a GrhD1. Para esto, se construyeron los plásmidos de bajo número de copias pK3-GrhD1 y pK3-GrhD1-FLAG, que expresan constitutivamente las proteínas GrhD1 y GrhD1-FLAG, respectivamente, a partir de un promotor *lac*. Inesperadamente, los plásmidos pK3-GrhD1 y pK3-GrhD1-FLAG disminuyeron más la invasión de la mutante $\Delta grhD1$ a células HeLa; además, estos plásmidos también inhibieron drásticamente la invasión de la cepa WT (Figura 20A). Para investigar más este fenómeno, se monitoreó por medio de Western blot la expresión de la proteína GrhD1-FLAG a partir del gen *grhD1::3XFLAG* localizado en el cromosoma y la producida a partir del plásmido pK3-GrhD1-FLAG. Como se muestra en la figura 20B, GrhD1-FLAG alcanza unos niveles mucho más altos de expresión a partir del plásmido pK3-GrhD1-FLAG que del gen cromosomal. En conjunto, estos resultados indican que tanto la ausencia como la sobre-expresión de GrhD1 afectan negativamente la invasión de *S. Typhimurium* a células del hospedero de manera independiente a la movilidad.

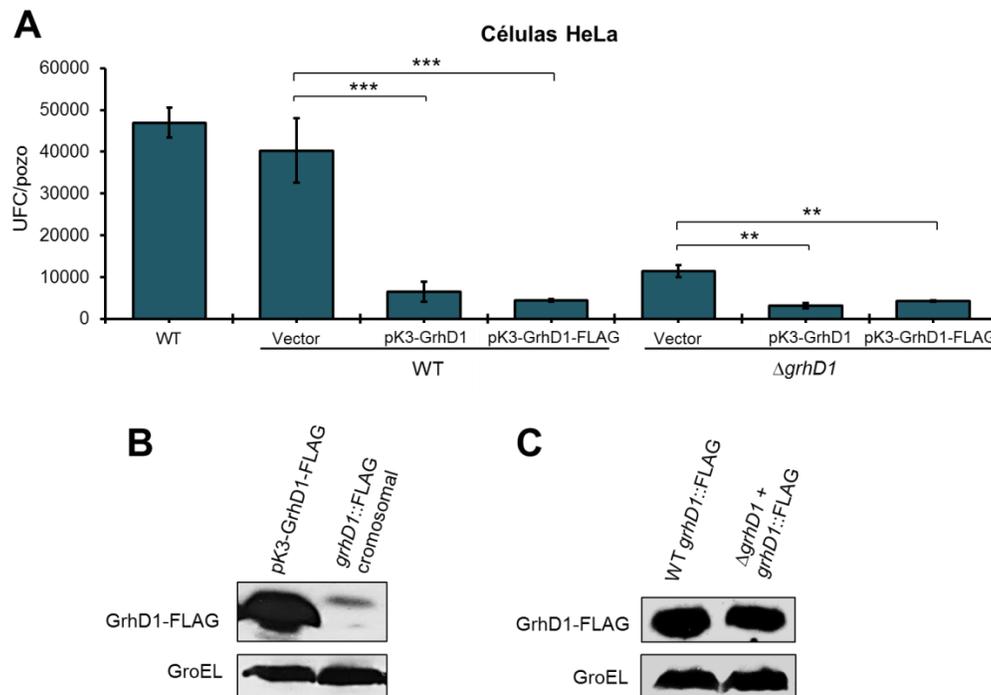


Figura 20. La sobre-expresión de GrhD1 disminuye la invasión de *S. Typhimurium* a células HeLa. (A) Se infectaron células HeLa con la cepa WT de *S. Typhimurium* y su mutante isogénica $\Delta grhD1$, conteniendo o no el vector pMPM-K3 o los plásmidos pK3-GrhD1 o pK3-GrhD1-FLAG, que expresan constitutivamente a las proteínas GrhD1 y GrhD1-FLAG, respectivamente. El valor de invasión de cada cepa se obtuvo al contabilizar las UFCs intracelulares a 1 h post-infección, usando un ensayo de protección a la gentamicina. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). La expresión del gen *grhD1-FLAG* del plásmido pK3-GrhD1-FLAG y del localizado en el cromosoma de la cepa WT de *S. Typhimurium* (B), o la expresión del gen *grhD1-FLAG* localizado en el cromosoma de la cepa WT de *S. Typhimurium* y del insertado en el cromosoma de la cepa mutante $\Delta grhD1$ (C), fue analizada mediante Western blot usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Se prepararon lisados celulares totales de muestras de cultivos bacterianos crecidos en LB a 37°C. Como control de carga, se determinó la expresión de GroEL usando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

Debido a que los resultados anteriores indican que se requiere de una concentración específica de GrhD1 para su función en la invasión de *S. Typhimurium* a células de su hospedero, se decidió complementar la mutante $\Delta grhD1$ insertando el alelo *grhD1::3XFLAG* en el cromosoma (Figura 21A). La expresión de GrhD1-FLAG fue similar en la cepa complementada $\Delta grhD1 + grhD1-FLAG-kan$ y la cepa WT con el alelo *grhD1::3XFLAG* (Figura 20C). De acuerdo a

lo esperado, la cepa complementada $\Delta grhD1 + grhD1::3XFLAG-kan$ presentó un fenotipo de invasión similar al de la cepa WT en células HeLa y macrófagos (Figura 21A y B). Estos resultados confirman que GrhD1 es un factor adicional que requiere *S. Typhimurium* para la invasión de sus células hospederas.

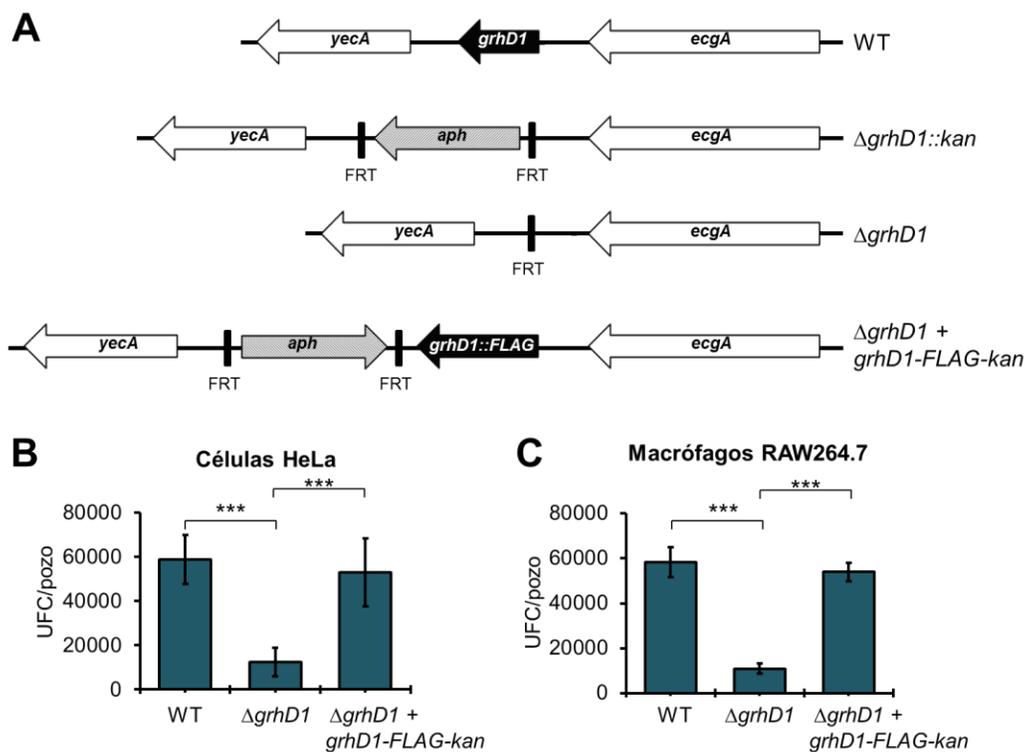


Figura 21. Generación de las cepas mutantes $\Delta grhD1$ y la cepa complementada $\Delta grhD1 + grhD1-FLAG-kan$, y su fenotipo de invasión. (A) La cepa mutante $\Delta grhD1::kan$ fue obtenida reemplazando el gen *grhD1* en la cepa WT de *S. Typhimurium* con un gen de resistencia kanamicina usando la recombinasa λ Red; posteriormente, el gen de kanamicina fue eliminado de la mutante $\Delta grhD1::kan$ usando la recombinasa FLP, obteniéndose la mutante $\Delta grhD1$. La cepa complementada $\Delta grhD1 + grhD1-FLAG-kan$ se obtuvo al insertar en *cis* el gen *grhD1-FLAG* junto con el gen de resistencia a kanamicina en dirección opuesta, dentro del cromosoma de la mutante $\Delta grhD1$, usando la recombinasa λ Red. Se infectaron células HeLa (B) y macrófagos RAW264.7 (C) con la cepa WT de *S. Typhimurium* y su mutante isogénica $\Delta grhD1$ así como con la cepa complementada $\Delta grhD1 + grhD1-FLAG-kan$, durante 15 min, posteriormente se cambió el medio DMEM por uno suplementado con gentamicina para matar a las bacterias extracelulares. El valor de invasión de cada cepa se obtuvo al contabilizar las UFCs intracelulares a 1 h post-infección. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (***, $p < 0.001$).

También se investigó si *grhD1* tiene un papel durante la sobrevivencia/replicación de *Salmonella* dentro de células hospederas. Para esto, se infectaron macrófagos RAW264.7 y células HeLa con la cepa WT de *S. Typhimurium* y la mutante $\Delta grhD1$, así como con la mutante $\Delta ssrB$, usada como control positivo. A horas específicas después de la infección se lisaron las células y se obtuvo el número de UFCs recuperadas; la replicación fue calculada como el incremento en el número de UFCs con respecto a la hora 1 post-infección. Como se esperaba, la mutante $\Delta ssrB$ presentó un fenotipo de replicación afectado, el cual fue más evidente en macrófagos que en células HeLa. En contraste, el fenotipo de replicación de la mutante $\Delta grhD1$ fue similar al mostrado por la cepa WT tanto en macrófagos como en células HeLa (Figura 22A y B).

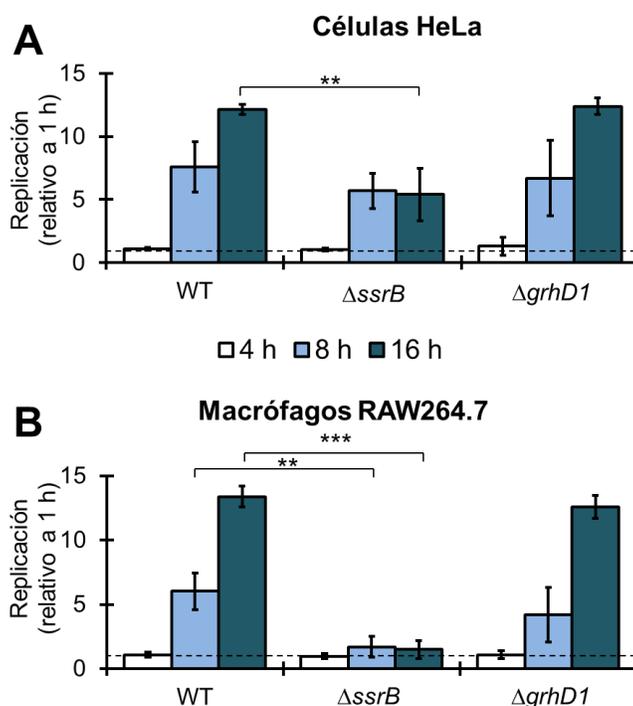


Figura 22. No se requiere de GrhD1 para la replicación/sobrevivencia de *S. Typhimurium* en células HeLa y macrófagos. Se infectaron células HeLa (A) y macrófagos de ratón RAW264.7 (B) con la cepa WT de *S. Typhimurium* y sus mutantes isogénicas $\Delta grhD1$ y $\Delta ssrB$ durante 15 min, posteriormente se cambió el medio DMEM por uno suplementado con gentamicina para matar a las bacterias extracelulares. Las UFCs intracelulares de cada cepa se determinaron a partir de lisados de células infectadas a las 1, 4, 8 y 16 h post-infección. La replicación se representa como las UFCs recuperadas a las horas indicadas divididas entre las UFCs recuperadas a 1 h post-infección para cada cepa. La línea punteada indica el valor de 1. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Por lo tanto, estos resultados indican que *grhD1* se requiere para la invasión de *S. Typhimurium* a células de su hospedero, pero no para su replicación intracelular.

9.1.7. GrhD1 contribuye a la respuesta inflamatoria intestinal producida por la infección de *S. Typhimurium* en ratón

La invasión de *Salmonella* a células epiteliales del intestino eventualmente conlleva al desarrollo de enterocolitis (Fabrega and Vila, 2013). Para determinar si GrhD1 es necesario para la inducción de la inflamación intestinal, se analizó la infección causada por la cepa WT de *S. Typhimurium* y su mutante $\Delta grhD1$ en ratones pre-tratados con estreptomycin, el cual es utilizado como un modelo de colitis causada por *S. Typhimurium* (Barthel *et al.*, 2003). Como se esperaba, la cepa WT fue capaz de colonizar el intestino (ciego e íleon) y bazo de los ratones (Figura 23D). Además, los ratones infectados con la cepa WT mostraron un peso reducido del ciego y una infiltración de neutrófilos incrementada en el contenido del ciego (Figura 23A y C), dos marcadores de la respuesta inflamatoria intestinal inducida por *S. Typhimurium* en ratones pre-tratados con estreptomycin (Barthel *et al.*, 2003). De manera interesante, la mutante $\Delta grhD1$ colonizó el ciego de manera similar que la cepa WT (Figura 23D); sin embargo, los ratones infectados con la mutante $\Delta grhD1$ tuvieron un incremento significativo en el peso del ciego y una reducción significativa en la infiltración de neutrófilos en el contenido del ciego en comparación con los ratones infectados con la cepa WT (Figura 23A y C). Adicionalmente, la mutante $\Delta grhD1$ mostró una reducción de 3 veces en la colonización del íleon con respecto a la cepa WT (Figura 23D). En contraste, la mutante $\Delta grhD1$ y la cepa WT colonizaron de manera similar el bazo (Figura 23D), y los ratones infectados con estas cepas tuvieron un peso similar del bazo (Figura 23B). Estos resultados muestran que GrhD1 está involucrado en la infección intestinal, particularmente en la respuesta inflamatoria intestinal inducida por *S. Typhimurium* en el modelo del ratón pre-tratado con estreptomycin.

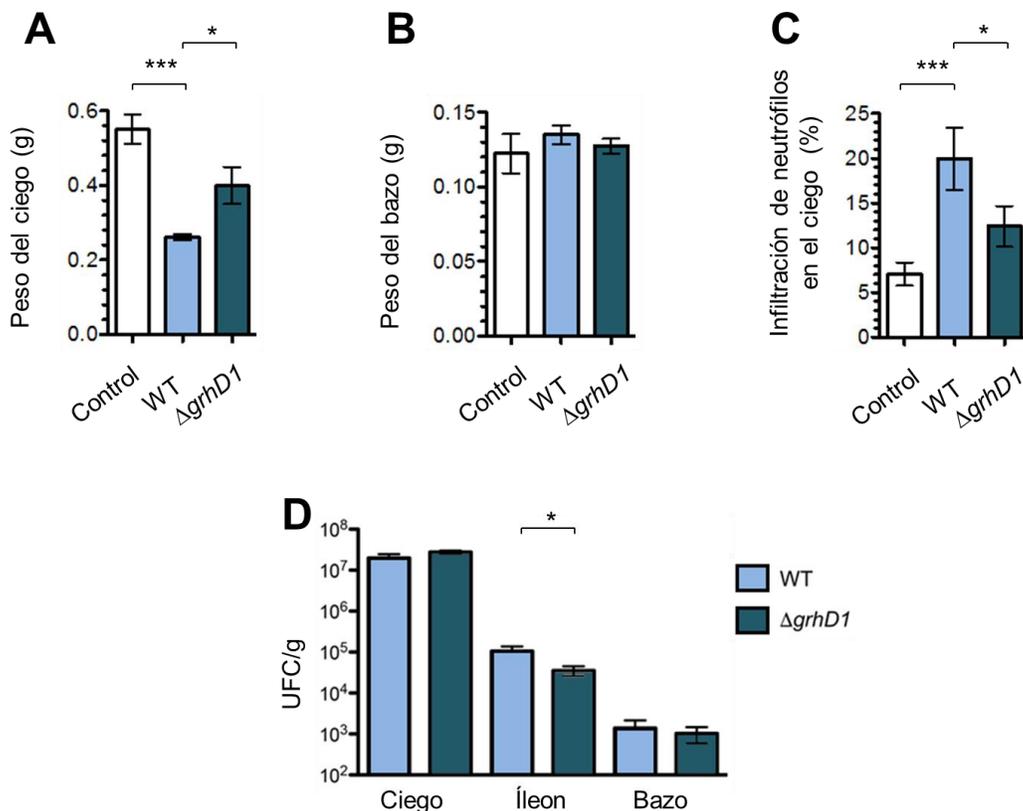


Figura 23. GrhD1 contribuye a la respuesta inflamatoria intestinal inducida por *S. Typhimurium* en ratón. Ratones pre-tratados con estreptomicina fueron infectados con la cepa WT de *S. Typhimurium* o la mutante $\Delta grhD1$, o tratados con PBS 1X estéril (Control). Los ratones fueron sacrificados dos días después de ser infectados y el peso total (g) del ciego (**A**) y del bazo (**B**), así como la infiltración de los neutrófilos en el contenido del ciego (**C**) y también las UFCs/g de ciego, íleon y bazo (**D**), fueron calculados en cada ratón. Las muestras del contenido en el ciego fueron analizadas por microscopia para determinar el número de neutrófilos con respecto al total de células eucariotas, el cual es expresado como porcentaje. Los datos son el promedio de cuatro animales diferentes. Las barras representan las desviaciones estándar. Los valores estadísticamente diferentes son indicados (* $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

9.1.8. GrhD1 no se secreta y no se requiere para la secreción de las proteínas de SPI-1 o para la movilidad de *S. Typhimurium*

En *S. Typhimurium* el gen *grhD1* codifica para una proteína de 101 aminoácidos, su estructura secundaria predicha muestra que forma cuatro hélices α y cuatro hojas β (Figura 24). GrhD1 no tiene ortólogos en otras bacterias y no contiene algún dominio conservado.



Figura 24. Estructura secundaria predicha para la proteína GrhD1. Secuencia de aminoácidos y predicción de la estructura secundaria de GrhD1. Las flechas y los cilindros indican las hojas β y hélices α predichas, respectivamente.

Para comenzar a elucidar la posible función de la proteína GrhD1, se determinó si se secreta al medio de cultivo. Se ha descrito que efectores, como aquéllos codificados en SPI-1 y que tienen un papel en el paso de invasión, son secretados al medio a través del SST3-1, cuando *Salmonella* crece en medio LB (Fabrega and Vila, 2013). Para esto, se evaluó la presencia de la proteína GrhD1-FLAG expresada a partir del plásmido pK3-GrhD1-FLAG, en el sobrenadante de cultivos bacterianos de la cepa WT de *S. Typhimurium*, crecidos en medio LB. Las proteínas secretadas fueron precipitadas utilizando ácido tricloroacético. Adicionalmente, se analizó también la presencia de esta proteína en extractos bacterianos totales de los mismos cultivos. La proteína GrhD1-FLAG fue detectada en el extracto total pero no en el sobrenadante (Figura 25A) Como control de este experimento, se etiquetó con el epítipo 3XFLAG a la proteína efectora AvrA, expresada a partir de SPI-1 y que se secreta a través del SST3-1 (Fabrega and Vila, 2013), y se analizó su expresión y secreción. Como se esperaba, se detectó a la proteína AvrA-FLAG en el extracto total así como en el sobrenadante (Figura 25B). Estos resultados muestran que GrhD1 es una proteína que no se secreta al medio cuando *Salmonella* crece en medio LB.

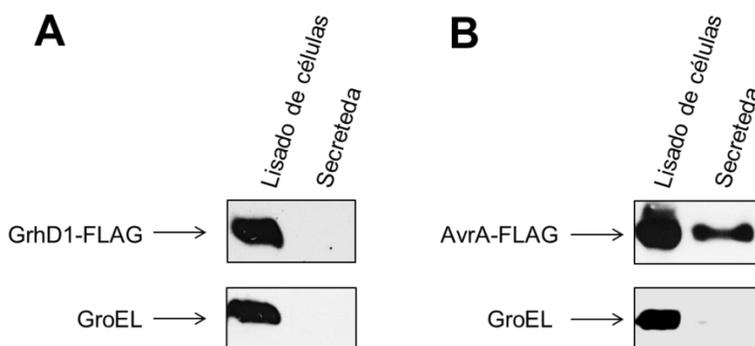


Figura 25. GrhD1 es una proteína que no se secreta. Detección de GrhD1-FLAG a partir de extractos celulares totales y proteínas secretadas en la cepa WT de *S. Typhimurium* conteniendo el

plásmido pK3-GrhD1-FLAG, que expresa constitutivamente a GrhD1-FLAG **(A)**. Como control positivo de secreción, se detectó a AvrA-FLAG, una proteína efectora secretada por el SST3-1, a partir de extractos celulares totales y proteínas secretadas de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene el gen *avrA* etiquetado a FLAG en el cromosoma **(B)**. Las muestras fueron preparadas a partir de cultivos bacterianos crecidos en medio LB durante 9 h a 37°C y analizadas por Western blot usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control negativo, se detectó a la proteína citoplásmica GroEL usando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

Posteriormente, se decidió evaluar si la ausencia de *grhD1* podría afectar la secreción de las proteínas de SPI-1, y como consecuencia, afectar el fenotipo de invasión de *Salmonella*. Para esto, se determinó el perfil de proteínas secretadas de la cepa WT de *S. Typhimurium* y sus mutantes $\Delta grhD1$ y $\Delta grhD1 + grhD1-FLAG-kan$, así como el de la mutante $\Delta hilD$, incluida como control. Cuando *S. enterica* crece en medio LB se puede detectar en el medio de cultivo la secreción de las proteínas SipA, SipB, SipC y SipD, proteínas efectoras de SPI-1, así como FliC, subunidad principal del flagelo. La mutante $\Delta grhD1$ y la cepa complementada $\Delta grhD1 + grhD1-FLAG-kan$ presentaron un perfil de secreción similar al de la cepa WT; como se esperaba, en la mutante $\Delta hilD$ solo se detectó la proteína FliC (Figura 26A). Estos datos indican que la ausencia de *grhD1* no tiene un efecto evidente en la secreción de proteínas codificadas en SPI-1, y descartan que la disminución en el fenotipo de invasión de la mutante $\Delta grhD1$ se deba a un inadecuado funcionamiento del SST3-1.

Finalmente, se decidió determinar el fenotipo de movilidad de *S. Typhimurium* en ausencia de *grhD1*. *S. enterica* requiere ser móvil para poder llegar a contactar a las células del epitelio intestinal de sus hospederos; un defecto en la movilidad de la bacteria puede conllevar a un fenotipo de invasión disminuido. Aunque nuestros resultados muestran que el complejo FlhDC, el regulador positivo maestro de los genes para la movilidad, no regula la expresión de *grhD1* (Figura 11B), y que la invasión a células HeLa sigue afectada cuando se favorece el contacto de *Salmonella* con estas células por medio de un paso de centrifugación, se decidió corroborar que la ausencia de este gen no afecta la movilidad de *S. Typhimurium*. Para esto realizamos ensayos de movilidad en agar LB suave, donde la movilidad de *S. Typhimurium* se observa como halos de difusión radial alrededor del inóculo inicial, mientras que las cepas no móviles crecen únicamente en el punto de inoculación. La movilidad de la cepa mutante $\Delta grhD1$ no se afectó significativamente con respecto a la movilidad de la cepa WT;

la cepa complementada $\Delta grhD1 + grhD1-FLAG-kan$ presentó una movilidad similar que la cepa WT. En contraste, la mutante $\Delta flhDC$, incluida como control positivo, no mostró movilidad (Figura 26B). Este resultado indica que el fenotipo de movilidad de *S. Typhimurium* no se afecta en ausencia del gen *grhD1*, descartando que el fenotipo de invasión disminuido en células HeLa y macrófagos de la cepa mutante $\Delta grhD1$ se deba a un defecto en la movilidad.

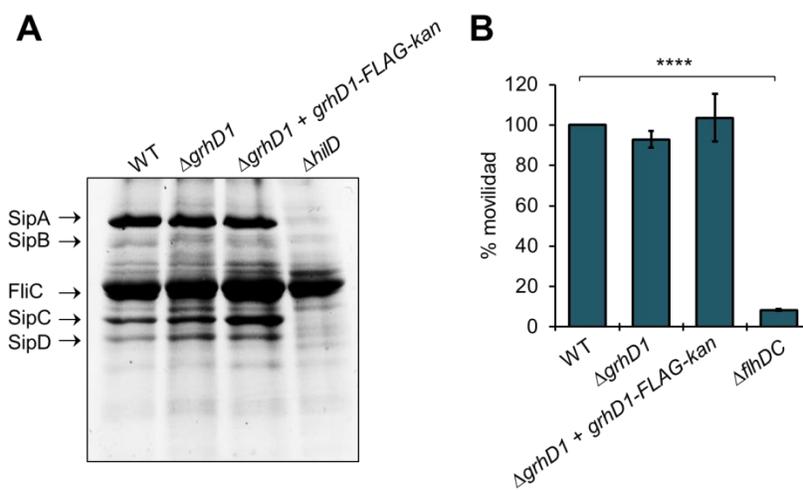


Figura 26. GrhD1 no se requiere para la actividad del SST3-1 o para la movilidad. (A) Perfil de proteínas secretadas de la cepa WT de *S. Typhimurium* y sus mutantes isogénicas $\Delta grhD1$ y $\Delta grhD1 + grhD1-FLAG-kan$. Las proteínas SipA, SipB, SipC y SipD son proteínas codificadas en SPI-1 y se secretan por el SST3-1. La mutante $\Delta hilD$, que no expresa las proteínas SipA-D, fue utilizada como control. FliC es una proteína flagelar cuya secreción no es dependiente de SPI-1. Las cepas bacterianas se crecieron en LB a 37°C durante 9 h. **(B)** Movilidad de la cepa WT de *S. Typhimurium* y sus mutantes isogénicas $\Delta grhD1$ y $\Delta grhD1 + grhD1-FLAG-kan$. La mutante $\Delta flhDC$ que carece de FlhDC, el regulador positivo central de los genes flagelares, fue evaluada como control positivo. Las cepas fueron inoculadas en placas de agar LB suave (0.3%) a 37°C por 7 h. La distancia (mm) migrada por cada cepa mutante se comparó con la de la cepa WT, la cual es mostrada como el porcentaje con respecto a la cepa WT. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por quintuplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (****, $p < 0.0001$).

9.2. Regulación y papel en virulencia del gen *grhD2* (SL1770)

9.2.1. HiID regula de manera positiva la expresión de *grhD2* a través de SprB

Para investigar el mecanismo de regulación mediado por HiID para *grhD2*, inicialmente se complementó la cepa mutante $\Delta hiID$ con el plásmido pK6-HiID, que expresa a HiID, y se monitoreó la expresión de la proteína GrhD2-FLAG. Para esto, se obtuvieron extractos de proteína total de muestras de cultivos de las cepas de *S. Typhimurium* SL1344 WT y la mutante isogénica $\Delta hiID$ conteniendo o no el plásmido pK6-HiID o el vector pMPM-K6 Ω , crecidas en medio LB a 37°C y fueron analizados por Western blot utilizando anticuerpos anti-FLAG. La expresión de GrhD2-FLAG se redujo drásticamente en la mutante $\Delta hiID$ con o sin el vector pMPM-K6 Ω , mientras que la expresión de HiID a partir del plásmido pK6-HiID restauró la expresión de GrhD2-FLAG en la mutante $\Delta hiID$ al nivel alcanzado en la cepa WT (Figura 27). Este resultado, junto con aquéllos reportados previamente en nuestro grupo, demuestra que HiID induce la expresión del gen *grhD2*.

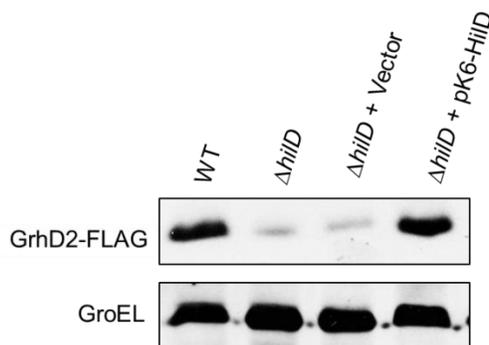


Figura 27. HiID regula positivamente la expresión de GrhD2. Expresión de GrhD2-FLAG en la cepa WT de *S. Typhimurium* y su mutante derivativa $\Delta hiID$ conteniendo o no el plásmido pK6-HiID, que expresa a HiID a partir de un promotor inducible por arabinosa, o conteniendo el vector pMPM-K6 Ω . La expresión de GrhD2-FLAG fue analizada a partir de lisados celulares totales de muestras de cultivos bacterianos crecidos en LB a 37°C por Western blot usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control de carga, se determinó la expresión de GroEL usando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

Posteriormente, para definir si HiID regula directa o indirectamente a *grhD2*, se analizó la interacción de HiID con la región reguladora de *grhD2* mediante EMSAs, utilizando la proteína MBP-HiID purificada y la región reguladora contenida en la fusión transcripcional *grhD2-cat*, como control negativo interno de

estas reacciones se usó la región reguladora de *sigD* y como control positivo la región reguladora de *hilA*. La proteína MBP-HilD no se unió a los fragmentos de DNA que contienen la regiones reguladoras de *grhD2* o *sigD* (Figura 28A) pero sí a *hilA* (Figura 28B). Estos resultados muestran que HilD regula de manera indirecta la expresión de *grhD2*.

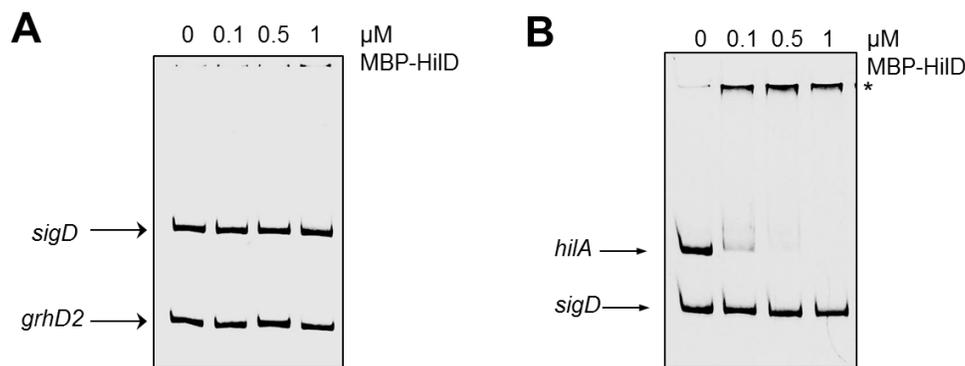


Figura 28. HilD no se une a la región reguladora del gen *grhD2*. Se llevaron a cabo EMSAs con las regiones reguladoras de los genes *grhD2* (A) y *hilA* (B), con concentraciones crecientes de la proteína purificada MBP-HilD (0, 0.1, 0.5 y 1 μM). Un fragmento de DNA conteniendo la región reguladora de *sigD* fue usado con control negativo interno. Los complejos DNA-proteína fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con bromuro de etidio.

Diferentes estudios han mostrado que HilD induce la expresión de un gran número de genes de virulencia a través de distintas cascadas que involucran a los reguladores transcripcionales HilA, InvF, HilC, RtsA, SsrA/B y FlhDC (Bustamante *et al.*, 2008; Golubeva *et al.*, 2012; Fabrega and Vila, 2013; Mouslim and Hughes, 2014; Singer *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2016). Para investigar si alguno de estos reguladores se requiere para la expresión de *grhD2* mediada por HilD, se monitoreó la actividad de la fusión transcripcional *grhD2-cat* en la cepa WT de *S. Typhimurium* y las mutantes $\Delta hilC$, $\Delta hilA$, $\Delta invF$, $\Delta rtsA$, $\Delta ssrB$, y $\Delta flhDC$, así como en las mutantes $\Delta SPI-1$ y $\Delta hilD$, utilizadas como control positivo. Como se esperaba, la expresión de la fusión *grhD2-cat* disminuyó en las mutantes $\Delta SPI-1$ y $\Delta hilD$; sin embargo, su expresión no se afectó en las mutantes $\Delta hilC$, $\Delta hilA$, $\Delta invF$, $\Delta rtsA$, $\Delta ssrB$ y $\Delta flhDC$, con respecto a la cepa WT (Figura 29). Estos resultados indican que HilD induce la expresión de *grhD2* a través de una cascada de regulación diferente a alguna caracterizada previamente.

Resultados de RNA-seq previos indican que HilD controla positivamente la expresión de otros dos reguladores transcripcionales específicos de *Salmonella*,

SprB y SinR (Colgan *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2016), codificados en SPI-1 y SPI-6, respectivamente. SprB ha sido involucrado en la expresión de algunos genes de virulencia de *S. Typhimurium* (Saini and Rao, 2010; Smith *et al.*, 2016), mientras que SinR permanece sin caracterizar. Para investigar si SprB y/o SinR están involucrados en la expresión de *grhD2* mediada por HilD, se monitoreó la expresión de la fusión *grhD2-cat* en las mutantes $\Delta sprB$ y $\Delta sinR$. La expresión de esta fusión disminuyó en la mutante $\Delta sprB$, a un nivel similar que en las mutantes $\Delta SPI-1$ y $\Delta hilD$, mientras que no se afectó en la mutante $\Delta sinR$ (Figura 29), lo cual sugiere que también se requiere de SprB para la expresión de *grhD2*.

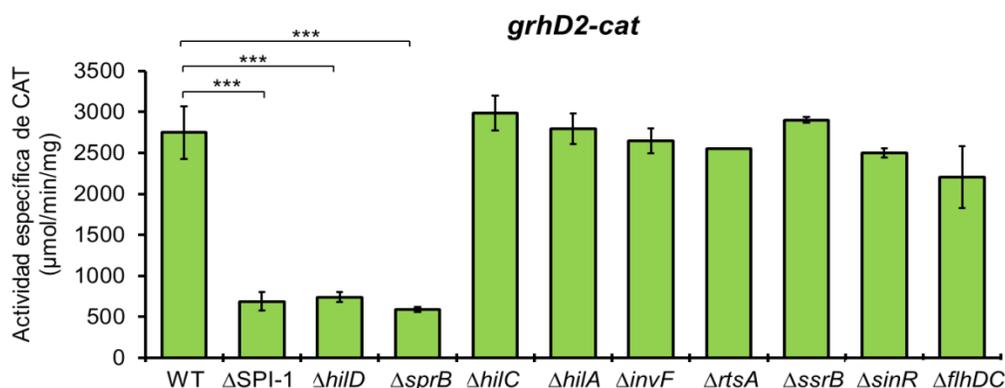


Figura 29. HilD y SprB controlan positivamente la expresión del gen *grhD2*, no así HilC, HilA, InvF, RtsA, SsrB, SinR o FlhDC. La expresión de la fusión transcripcional *grhD2-cat*, contenida en el plásmido pgrhD2-cat, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y sus cepas mutantes $\Delta SPI-1$, $\Delta hilD$, $\Delta sprB$, $\Delta hilC$, $\Delta hilA$, $\Delta invF$, $\Delta rtsA$, $\Delta ssrB$, $\Delta sinR$ y $\Delta flhDC$. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 9 h en LB a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (***, $p < 0.001$).

Entonces, para confirmar que SprB regula de manera positiva a *grhD2*, se determinó la expresión de la fusión *grhD2-cat* en la cepa WT de *S. Typhimurium* y en la mutante $\Delta sprB$ conteniendo o no el vector pMPM-K6 Ω , o el plásmido pK6-SprB, que expresa a la proteína SprB bajo un promotor inducible por arabinosa, en medio LB. El plásmido pK6-SprB restauró la expresión de la fusión *grhD2-cat* en la mutante $\Delta sprB$ a un nivel incluso mayor que el de la cepa WT (Figura 30A). Interesantemente, la expresión de HilD a partir del plásmido pK6-HilD indujo la expresión de la fusión *grhD2-cat* en la mutante $\Delta hilD$, pero no en la mutante

$\Delta sprB$, mientras que la expresión de SprB a partir del plásmido pK6-SprB sí fue capaz de inducir la expresión de esa fusión en la mutante $\Delta hilD$ (Figura 30A). Se obtuvieron resultados similares por medio de ensayos de Western blot, donde se monitoreó la expresión de la proteína GrhD2-FLAG en las mismas cepas usadas anteriormente (Figura 30B). En conjunto, estos resultados indican que HilD requiere de SprB para activar la expresión de *grhD2* en medio LB.

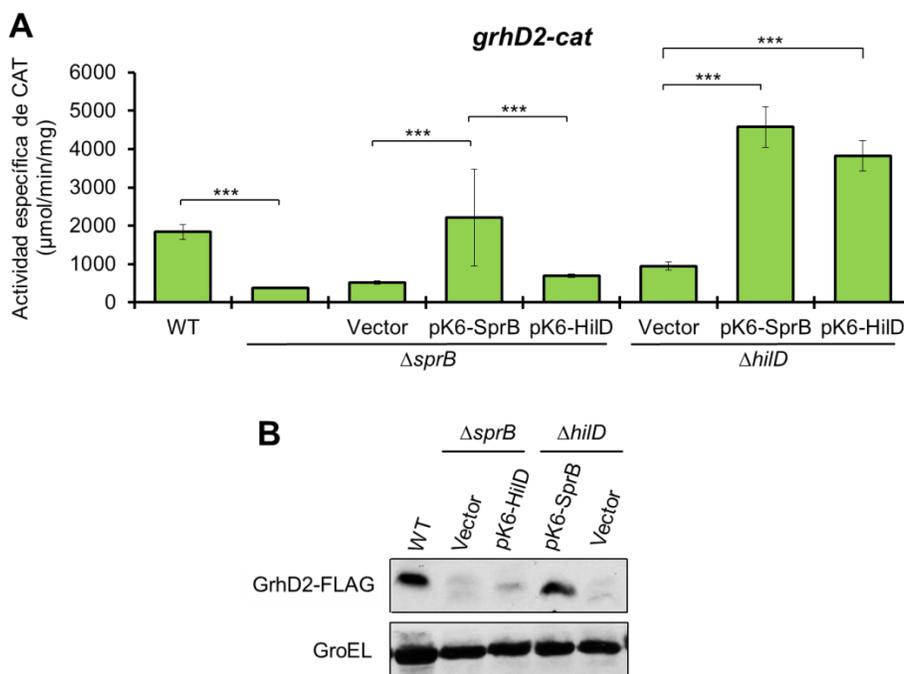


Figura 30. HilD actúa a través de SprB para activar la expresión del gen *grhD2*. (A) La expresión de la fusión transcripcional *grhD2-cat*, contenida en el plásmido pgrhD2-cat, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y su derivada mutante $\Delta sprB$ conteniendo o no el vector pMPM-K6 Ω , el plásmido pK6-SprB o el plásmido pK6-HilD, que expresan a SprB o HilD bajo un promotor inducible por arabinosa, respectivamente; así como en la mutante $\Delta hilD$ conteniendo el vector pMPM-K6 Ω o los plásmidos pK6-SprB o pK6-HilD. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (***, $p < 0.001$). (B) La expresión de GrhD2-FLAG en la cepa WT de *S. Typhimurium* y su derivada mutante $\Delta sprB$ conteniendo el vector pMPM-K6 Ω o el plásmido pK6-HilD, así como en la mutante $\Delta hilD$ conteniendo el vector pMPM-K6 Ω o el plásmido pK6-SprB, fue analizada por Western blot mediante anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control de carga, los niveles de expresión de la proteína GroEL fueron determinados usando anticuerpos policlonales anti-GroEL. La expresión de SprB y HilD a partir del plásmido pK6-SprB y pK6-HilD, respectivamente, fue inducida con 0.001% de L-arabinosa. La actividad específica de CAT y la expresión de GrhD2-FLAG fue determinada a partir de muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 9 h en medio LB a 37°C.

Resultados obtenidos mediante secuenciación de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP-seq) revelaron que SprB se une a la región reguladora de *grhD2* *in vivo* (Smith *et al.*, 2016). Aunque se planteó confirmar por medio de EMSAs que SprB se une a la región reguladora de *grhD2*, no se logró purificar a la proteína SprB etiquetada con el epítipo 6XHis, probablemente por su alta insolubilidad. Por lo que como alternativa, se investigó si SprB requiere de otro regulador de *Salmonella* para inducir la expresión de *grhD2*. Para esto, se analizó la expresión de la fusión *grhD2-cat* en la cepa WT de *S. Typhimurium* y en la cepa WT de *E. coli* MC4100 conteniendo o no el vector pMPM-K6Ω o el plásmido pK6-SprB, en este experimento también se evaluó el efecto del plásmido pK6-HilD. Como control negativo, se monitoreó la actividad de una fusión transcripcional al gen reportero *cat* de *sirA*, un gen cuya expresión se esperaba no fuera controlada por SprB; un ortólogo de *sirA* (*uvrY*) está presente en *E. coli* K-12 (Pernestig *et al.*, 2001; Goodier and Ahmer, 2001). La presencia de SprB, pero no de HilD, indujo la actividad de la fusión *grhD2-cat* en *E. coli* a un nivel similar al que alcanza esta fusión en *S. Typhimurium* (Figura 31A); en contraste, SprB no afectó la actividad de la fusión *sirA-cat* (Figura 31B). Estos resultados apoyan que SprB activa directamente la expresión de *grhD2*.

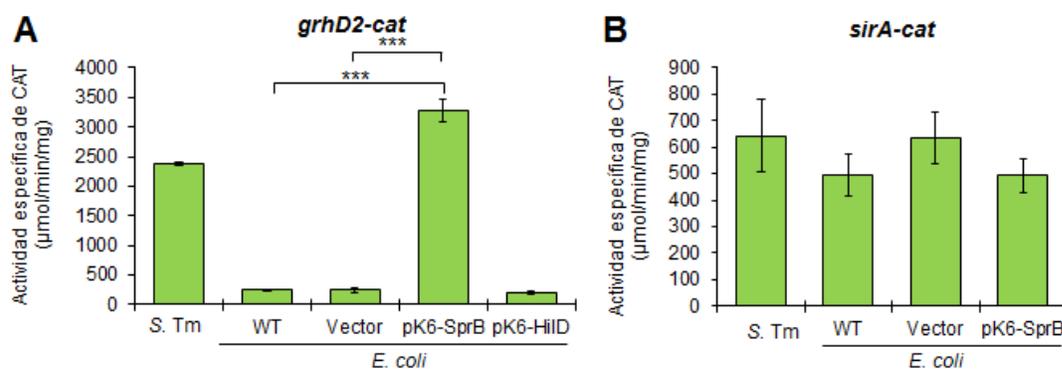


Figura 31. SprB no requiere otro regulador de *S. Typhimurium* para inducir la expresión del gen *grhD2* en *E. coli* K12. La expresión de las fusiones transcripcionales *grhD2-cat* (A) y *sirA-cat* (B), contenidas en los plásmidos pgrhD2-cat y psirA-cat, respectivamente, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y en la cepa WT de *E. coli* MC4100 conteniendo o no el vector pMPM-K6Ω o el plásmido pK6-SprB o pK6-HilD. La expresión de SprB o HilD a partir del plásmido pK6-SprB o pK6-HilD, respectivamente, fue inducida con 0.001% de L-arabinosa. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 9 h en medio LB a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (***, $p < 0.001$).

9.2.2. HilD induce directamente la expresión de *sprB* al desplazar a H-NS de su región reguladora

Los resultados descritos arriba sugieren que HilD regula positivamente la expresión de *sprB*. Un reporte previo mostró que la expresión de *sprB* puede estar controlada por la región reguladora corriente arriba de *hilC*, que genera un transcrito *hilC-sprB*, o por la región localizada corriente arriba de *sprB* (Smith *et al.*, 2016). La regulación de HilD sobre el promotor localizado corriente arriba de *hilC* ha sido mostrada en estudios previos (Ellermeier *et al.*, 2005; Olekhovich and Kadner, 2007; Petrone *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2016). Entonces, se decidió evaluar el efecto de HilD sobre la región reguladora situada corriente arriba de *sprB* construyendo una fusión transcripcional *sprB-cat* que contiene esta región. Se analizó la expresión de esta fusión en la cepa WT de *S. Typhimurium* y su mutante $\Delta hilD$, conteniendo o no el vector pMPM-K6 Ω y el plásmido pK6-HilD, creciendo a las cepas en LB. La expresión de la fusión *sprB-cat* se redujo 2 veces en la mutante $\Delta hilD$ con respecto a la cepa WT; la expresión de HilD a partir del plásmido pK6-HilD incrementó 3 veces la actividad de la fusión en la mutante $\Delta hilD$ (Figura 32A). Estos resultados indican que HilD también regula de manera positiva la expresión de *sprB* al actuar sobre la región reguladora localizada corriente arriba de este gen.

Para investigar si HilD regula la expresión de *sprB* directamente o a través de otro factor adicional específico de *Salmonella*, se analizó la expresión de la fusión *sprB-cat* en la cepa WT de *S. Typhimurium* y en la cepa WT de *E. coli* MC4100 conteniendo o no el vector pMPM-K6 Ω o el plásmido pK6-HilD en medio LB. Como se esperaba, la actividad de la fusión *sprB-cat* fue 3 veces más baja en la cepa de *E. coli* MC4100 que en la cepa WT de *S. Typhimurium* (Figura 32B). La expresión de HilD a partir del plásmido pK6-HilD indujo 3 veces la actividad de la fusión en *E. coli* (Figura 32B), lo que indica que HilD induce la expresión de *sprB* directamente. En apoyo a este resultado, experimentos de EMSAs revelaron que la proteína purificada MBP-HilD se une a la región reguladora situada corriente arriba de *sprB*, a partir de una concentración de 0.5 μ M, pero no se une a la región reguladora del gen *ppk*, usado como control negativo en estos ensayos (Figura 32C). Además, resultados previos del análisis por ChIP-seq indican que HilD se une a la región reguladora corriente arriba de *sprB* *in vivo* (Smith *et al.*, 2016).

Colectivamente, estos resultados indican que HilD controla positivamente la expresión de *grhD2* a través de SprB.

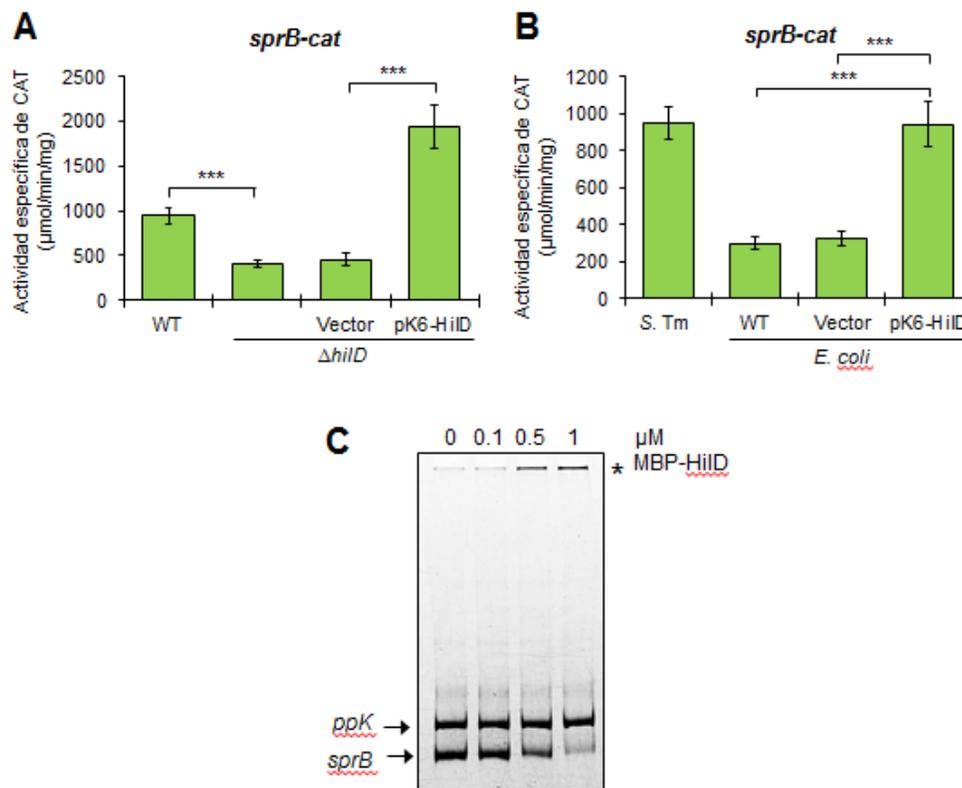


Figura 32. HilD regula positiva y directamente la expresión del gen *sprB*. La expresión de la fusión transcripcional *sprB-cat* contenida en el plásmido psprB-cat, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y su mutante $\Delta hilD$ que lleva el vector pMPM-K6Ω o el plásmido pK6-HilD **(A)**, así como en la cepa WT de *E. coli* MC4100 conteniendo el vector pMPM-K6Ω o el plásmido pK6-HilD **(B)**. La expresión de HilD a partir del plásmido pK6-HilD fue inducida con 0.001% de L-arabinosa. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 9 h en medio LB a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (***, $p < 0.001$). **(C)** Se llevaron a cabo EMSAs con la región reguladora de *sprB*, con concentraciones crecientes de la proteína purificada MBP-HilD. La región reguladora de *ppK* se incluyó como control negativo interno en todas las reacciones. Los complejos DNA-proteína (indicados con un asterisco) fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con bromuro de etidio.

HilD induce la expresión de sus genes blanco principalmente antagonizando la represión que ejerce H-NS sobre los respectivos promotores (Fabrega and Vila, 2013). Para conocer si HilD induce la expresión de *sprB* por un mecanismo similar, se determinó si la inactivación de H-NS conlleva a la expresión de *sprB* de manera independiente de HilD. Debido a que una mutante Δhrs de *Salmonella* presenta un defecto severo en el crecimiento (Navarre, 2006), se inactivó la actividad de H-NS

sobre-expresando a la mutante dominante negativa H-NS^{G113D}, que no es capaz de unirse al DNA pero si de formar heterodímeros con monómeros de H-NS WT (Ueguchi *et al.*, 1996). Entonces, se monitoreó la actividad de la fusión *sprB-cat* en la cepa WT de *S. Typhimurium* y su mutante $\Delta hilD$ que contiene o no el vector pMPM-T6 Ω , el plásmido pT6-HNS-WT que expresa a H-NS WT, y el plásmido pT6-HNS-G113D, el cual expresa a H-NS mutado. La inducción de la expresión de H-NS mutado, no así de H-NS WT, restauró la expresión de *sprB* en la mutante $\Delta hilD$ al nivel que alcanza en la cepa WT (Figura 33A). Asimismo, al analizar la expresión de la fusión *sprB-cat* en la cepa de *S. Typhimurium* WT y en las cepas de *E. coli* MC4100 WT y Δhns , en medio LB, se observó que la expresión de la fusión disminuyó 5 veces en la cepa WT de *E. coli*, en comparación con la cepa WT de *S. Typhimurium*, y que su expresión se indujo en la mutante *E. coli* Δhns (Figura 33B). Adicionalmente, para determinar si H-NS regula directamente a *sprB*, se realizaron EMSAs. En estos ensayos se utilizaron concentraciones crecientes de la proteína purificada H-NS-FH y la región reguladora localizada corriente arriba de *sprB*. Se incluyó la región reguladora de *ppK* como control negativo. Se observó que H-NS-FH se une a la región reguladora de *sprB* a partir de una concentración de 0.45 μ M, pero no a la de *ppK*, incluso a la concentración más alta de proteína utilizada (Figura 33C). Estos resultados muestran que H-NS reprime directamente la expresión de *sprB* y que cuando se inactiva a H-NS, o cuando no está presente H-NS, la expresión de este gen se vuelve independiente de HilD, lo que apoya que HilD actúa como un factor anti-H-NS en *sprB*.

Para determinar si HilD desplaza a H-NS de la región reguladora de *sprB*, se llevaron a cabo EMSAs competitivos. Se puso a interaccionar un fragmento de DNA que abarca la región reguladora de *sprB* con una concentración constante de H-NS-FH (0.6 μ M) y posteriormente se agregaron concentraciones crecientes de la proteína MBP-HilD. También se incluyeron reacciones de unión que solo contuvieran a H-NS-FH o MBP-HilD. Los complejos DNA-proteína se detectaron tiñendo los fragmentos de DNA con bromuro de etidio; adicionalmente, se detectó la presencia de H-NS-FH en estos complejos mediante Western blot con anticuerpos anti-FLAG. Como se muestra en la Figura 33D, conforme se fue incrementando la concentración de MBP-HilD, el complejo DNA-H-NS se fue modificando a un complejo de menor migración, similar al formado por MBP-HilD (panel superior); además, el Western blot muestra que al incrementarse la concentración de MBP-HilD la cantidad de H-NS-FH unida al fragmento de DNA

va disminuyendo (panel inferior), lo que indica que HilD es capaz de desplazar a H-NS de *sprB*.

En conjunto, estos resultados demuestran que HilD induce la expresión de *sprB* contrarrestando la represión de H-NS en *sprB*.

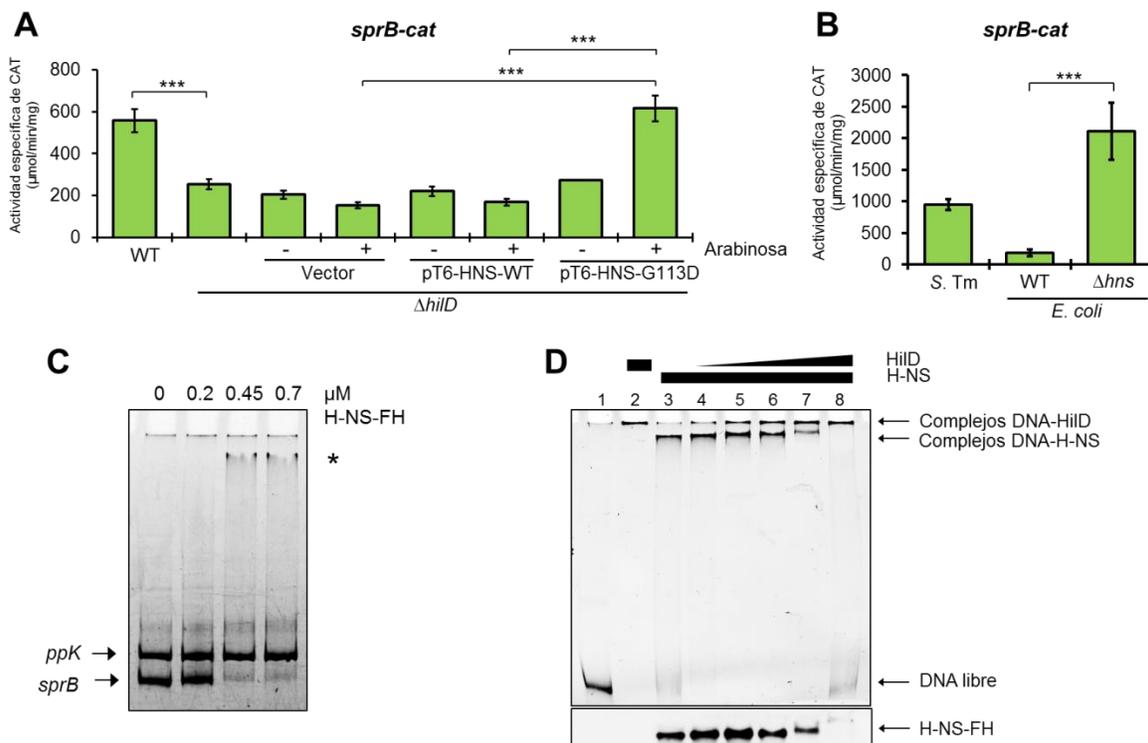


Figura 33. HilD desplaza a H-NS de la región reguladora de *sprB*. La expresión de la fusión transcripcional *sprB-cat* contenida en el plásmido *psprB-cat*, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 (**A, B**) y su derivada mutante $\Delta hilD$ conteniendo el vector pMPM-T6 Ω , el plásmido pT6-HNS-WT que expresa a H-NS WT, o el plásmido pT6-HNS-G113D, el cual expresa a H-NS mutante (**A**), así como en la cepa WT de *E. coli* MC4100 y su derivada mutante Δhns (**B**). La expresión de H-NS a partir de los plásmidos pT6-HNS-WT y pT6-HNS-G113D fue inducida con 0.1% de L-arabinosa. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 9 h en medio LB a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (***, $p < 0.001$). (**C**) Se llevaron a cabo EMSAs con la región reguladora de *sprB* y concentraciones crecientes de la proteína purificada H-NS-FH. Se incluyó como control negativo la región reguladora de *ppK*. Los complejos DNA-proteína (indicados con un asterisco) fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con bromuro de etidio. (**D**) EMSA competitivo entre HilD y H-NS con la región reguladora de *sprB*. Se agregó proteína purificada H-NS-FH a una concentración constante de 0.6 µM (carriles 3-8) y se añadió a la proteína MBP-HilD a concentraciones crecientes de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 µM (carriles 4 -8). No se añadió proteína en el carril 1 y se añadió 1 µM de la proteína MBP-

HilD en el carril 2. Los complejos DNA-proteína (indicados con un asterisco) fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con bromuro de etidio. El panel superior muestra los complejos DNA-proteína teñidos con bromuro de etidio y el panel inferior muestra la detección de la proteína H-NS-FH en los complejos DNA-proteína mediante Western blot.

9.2.3. H-NS no está involucrado en la expresión de *grhD2* en medio LB

Debido a los pocos blancos directos conocidos que son regulados por SprB, hasta el momento se desconoce el mecanismo por medio del cuál SprB induce la expresión de esos genes. Para comenzar a investigar esto, se decidió conocer si H-NS participa directamente en el control de la expresión de *grhD2*, pues de ser así, se necesitaría de un anti-represor de H-NS para inducir la expresión de *grhD2*, el cual podría ser SprB. Para esto, se analizó la expresión de la fusión *grhD2-cat* en la cepa de *S. Typhimurium* WT y en las cepas de *E. coli* MC4100 WT y Δ *hns*, en medio LB. Aunque la expresión de la fusión disminuyó 5 veces en la cepa WT de *E. coli*, en comparación con la cepa WT de *S. Typhimurium*, su expresión no se indujo en la mutante *E. coli* Δ *hns* (Figura 34A). Estos resultados apoyan que la expresión de *grhD2* no está regulada por H-NS en medio LB. Para corroborar lo anterior, se realizaron EMSAs con concentraciones crecientes de la proteína purificada H-NS-FH y la región reguladora de *grhD2*. Se incluyó la región reguladora de *sigD* como control negativo. Como se esperaba, se observó que H-NS-FH no se une a la región reguladora de *grhD2* o de *sigD* (Figura 34B). Este resultado, en conjunto con los análisis de expresión, muestra que H-NS no regula la expresión de *grhD2*, e indican que SprB no actúa como un factor anti-H-NS para inducir la expresión de *grhD2*.

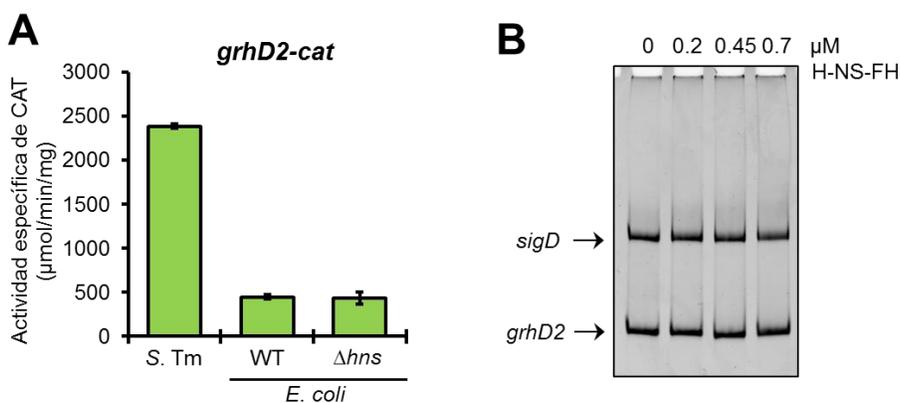


Figura 34. La expresión de *grhD2* no es regulada por H-NS. (A) La expresión de la fusión transcripcional *grhD2-cat* contenida en el plásmido *pgrhD2-cat*, se determinó en la cepa WT de *S.*

Typhimurium, así como en la cepa WT de *E. coli* MC4100 y su mutante isogénica Δhns . La actividad específica de CAT se determinó de muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos en LB durante 9 h a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. **(B)** EMSAs con la proteína purificada H-NS-FH (0, 0.2, 0.45 y 0.7 μ M) y un fragmentos de DNA que contiene la región reguladora de *grhD2*. Este fragmento de DNA corresponde al contenido en la fusión transcripcional *grhD2-cat*. Un fragmento de DNA conteniendo la región reguladora de *sigD* fue usado con control negativo interno. Los complejos DNA-proteína fueron analizados en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes al 6% teñidos con bromuro de etidio.

9.2.4. GrhD2 se requiere para la invasión de *S. Typhimurium* a células hospederas

HilD regula positivamente la expresión de numerosos genes que están principalmente implicados en el paso de invasión de *S. Typhimurium* a sus células hospederas (Fabrega and Vila, 2013; Colgan *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2016; Martínez-Flores *et al.*, 2016). Para definir si se requiere *grhD2* para este fenotipo de virulencia de *Salmonella*, se evaluó el fenotipo de invasión de la cepa WT de *S. Typhimurium* y su mutante $\Delta grhD2$ en células HeLa y macrófagos RAW264.7 en cultivo. Como controles, en estos ensayos se incluyeron a las cepas mutantes $\Delta hilD$ y $\Delta ssrB$. La mutante $\Delta grhD2$ presentó una reducción en su capacidad de invadir a células HeLa y macrófagos de alrededor de 4 veces, con respecto a la cepa WT. Como se esperaba, la mutante $\Delta ssrB$ tuvo el mismo fenotipo de invasión que la cepa WT, mientras que la mutante $\Delta hilD$ no fue capaz de invadir (Figura 35A y B). Estos resultados indican que se necesita de *grhD2* para que *S. Typhimurium* pueda invadir a sus células hospederas.

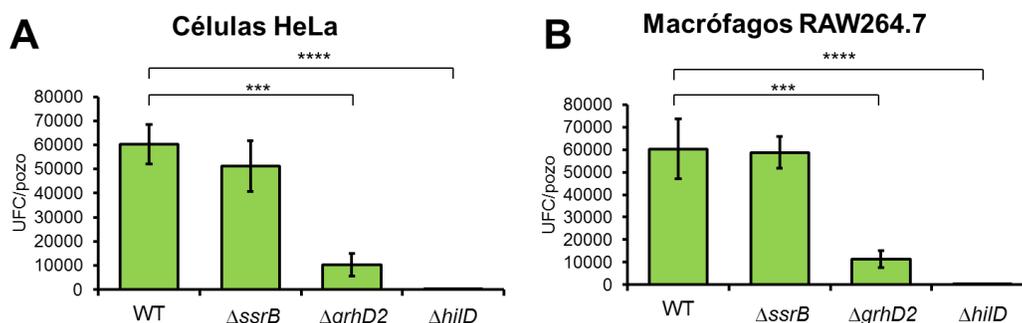


Figura 35. Se requiere de GrhD2 para la invasión de *S. Typhimurium* a células HeLa y macrófagos. Se infectaron células HeLa **(A)** y macrófagos RAW264.7 **(B)** con la cepa WT de *S. Typhimurium* y sus mutantes isogénicas $\Delta ssrB$, $\Delta grhD2$ y $\Delta hilD$. El valor de invasión de cada cepa se obtuvo al contabilizar las UFCs intracelulares a 1 h post-infección, usando un ensayo de

protección a la gentamicina. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

Para corroborar el fenotipo de invasión observado en ausencia de *grhD2*, se construyó la cepa mutante complementada $\Delta grhD2 + grhD2\text{-FLAG-kan}$, insertando el alelo *grhD2::3XFLAG* en el cromosoma de la mutante $\Delta grhD2$ (Figura 36A), y se analizó su fenotipo de invasión. Esta cepa complementada expresa a GrhD2-FLAG al mismo nivel que la cepa WT GrhD2-FLAG (Figura 36B). Los resultados obtenidos muestran que la cepa complementada $\Delta grhD2 + grhD2\text{-FLAG-kan}$ presenta un fenotipo de invasión similar al de la cepa WT en células HeLa y macrófagos (Figura 36C y D), por lo que estos datos confirman que GrhD2 es un factor adicional que requiere *S. Typhimurium* para la invasión de sus células hospederas.

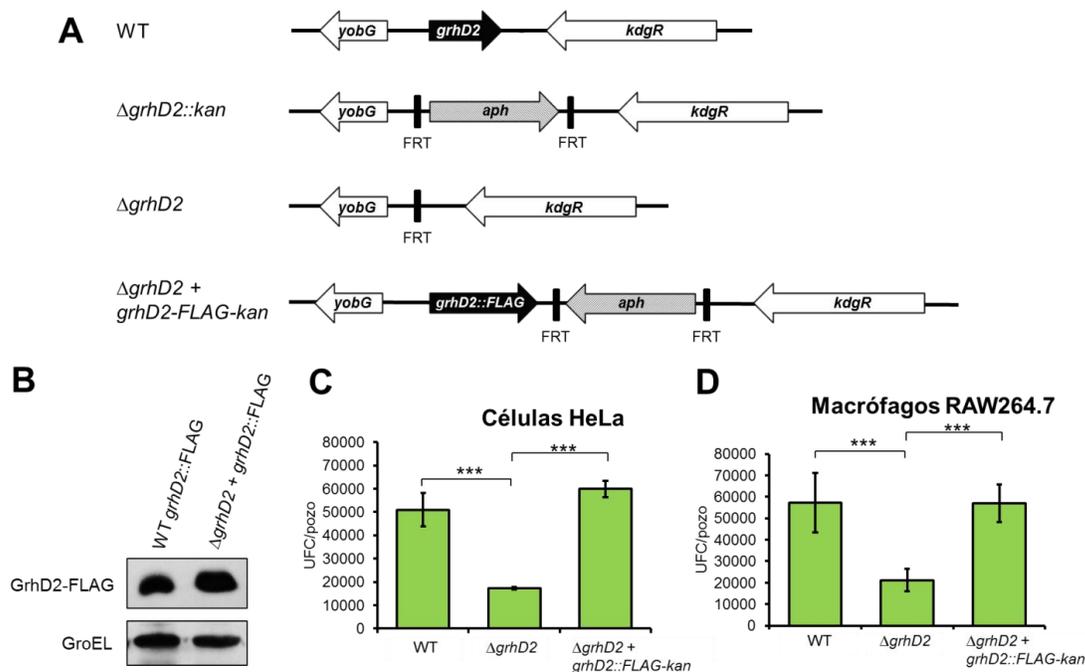


Figura 36. Generación de las cepas mutantes $\Delta grhD2$ y de la cepa complementada $\Delta grhD2 + grhD2\text{-FLAG-kan}$ y su fenotipo de invasión. (A) La cepa mutante $\Delta grhD2::kan$ fue obtenida reemplazando al gen *grhD1* en la cepa WT de *S. Typhimurium* con un gen de resistencia kanamicina usando la recombinasa λ Red; posteriormente, el gen de kanamicina fue eliminado de la mutante $\Delta grhD2::kan$ usando la recombinasa FLP, obteniéndose la mutante $\Delta grhD2$. La cepa complementada $\Delta grhD2 + grhD2\text{-FLAG-kan}$ se obtuvo al insertar en *cis* el gen *grhD2-FLAG* junto con el gen de resistencia a kanamicina en dirección opuesta, dentro del cromosoma de la mutante

$\Delta grhD2$, usando la recombinasa λ Red. **(B)** La expresión del gen $grhD2$ -FLAG localizado en el cromosoma de la cepa WT de *S. Typhimurium* y del insertado en el cromosoma de la cepa mutante $\Delta grhD2$, fue analizada mediante Western blot usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Se prepararon lisados celulares totales de muestras de cultivos bacterianos crecidos en LB a 37°C. Como control de carga, se determinó la expresión de GroEL usando anticuerpos policlonales anti-GroEL. Se infectaron células HeLa **(C)** y macrófagos RAW264.7 **(D)** con la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y su cepa derivada mutante $\Delta grhD2$, así como con la cepa complementada $\Delta grhD2 + grhD2$ -FLAG-kan, durante 15 min, posteriormente se cambió el medio DMEM por uno suplementado con gentamicina para matar a las bacterias extracelulares. Después de 1 h se lisaron las células y las bacterias intracelulares se contabilizaron obteniendo las UFCs en cajas de LB agar. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes con respecto a la cepa WT (***, $p < 0.001$).

Adicionalmente, aunque en ausencia de $grhD2$ no se afectó la movilidad de *Salmonella* en agar suave (Figura 37A), se realizaron experimentos de invasión en células HeLa centrifugando las placas de cultivo después de la infección con las bacterias. Con la centrifugación se reduce el requerimiento de la movilidad de *Salmonella* para la invasión a los cultivos de células. En estos ensayos también se observó que la mutante $\Delta grhD2$ presenta un fenotipo de invasión disminuido con respecto a la cepa WT (Figura 37B). Como control, en estos experimentos se analizó a la mutante $\Delta flhDC$, la cual no es móvil y por lo tanto no invade a células en cultivo; sin embargo, con la centrifugación se recuperó notablemente su fenotipo de invasión a estas células (Figura 37C). Estos resultados descartan que la movilidad esté involucrada en el defecto de invasión de la mutante $\Delta grhD2$ en células HeLa.

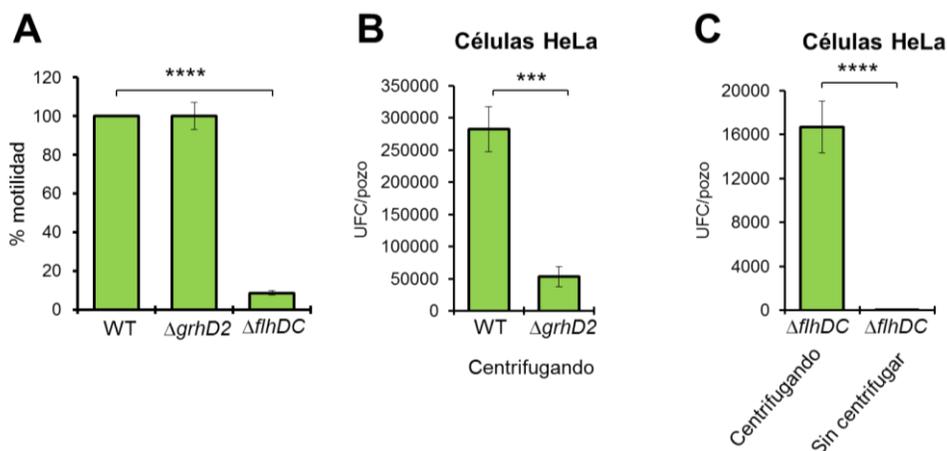


Figura 37. La movilidad no está involucrada en el defecto de invasión de la mutante $\Delta grhD2$. **(A)** Movilidad de la cepa WT de *S. Typhimurium* y su derivada mutante $\Delta grhD2$. La mutante $\Delta flhDC$

que carece de FlhDC, el regulador positivo central de los genes flagelares, fue evaluada como control positivo. Las cepas fueron inoculadas en placas de agar LB suave (0.3%) a 37°C por 7 h. La distancia (mm) migrada por cada cepa mutante se comparó con la de la cepa WT, la cual es mostrada como el porcentaje con respecto a la cepa WT. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por quintuplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (****, $p < 0.0001$). Se infectaron células HeLa con la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y su cepa derivada mutante $\Delta grhD2$ (B) o con la cepa mutante $\Delta flhDC$ (C), en los casos indicados inmediatamente se centrifugaron las placas durante 10 min a 1,000 g, y posteriormente se dejaron durante 10 min a 37°C, de lo contrario únicamente se infectaron durante 15 min. A continuación se cambió el medio DMEM por uno suplementado con gentamicina para matar a las bacterias extracelulares. Después de 1 h se lisaron las células y las bacterias intracelulares se contabilizaron obteniendo las UFCs en cajas de LB agar. Los datos son el promedio de dos experimentos independientes realizados por triplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (**, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

9.2.5. GrhD2 se requiere para la adherencia de *S. Typhimurium* a células HeLa

El primer paso para la invasión de *Salmonella* a sus células hospederas es la adherencia (Fabrega and Vila, 2013). Se ha reportado que en *S. Typhimurium* este paso se da rápidamente antes de la invasión, por lo que, en los experimentos de adherencia es necesario utilizar cepas que no sean capaces de invadir o adicionar agentes inhibidores del rearreglo del citoesqueleto, que es necesario para la invasión. Para evaluar si GrhD2 tiene un papel en el paso de adherencia de *S. Typhimurium* a sus células hospederas, se realizaron experimentos de adherencia en células HeLa utilizando las mutantes $\Delta invC$, $\Delta invC \Delta grhD2$, $\Delta invC \Delta ssrB$ y $\Delta invC \Delta siiE$. El gen *invC* codifica para la ATPasa del SST3-1, por lo tanto, la mutante $\Delta invC$ no es capaz de invadir. Las mutantes $\Delta invC \Delta ssrB$ y $\Delta invC \Delta siiE$ se usaron como control negativo y positivo, respectivamente, ya que el gen *ssrB* no es necesario para la adherencia pero el gen *siiE* sí lo es. Interesantemente, los resultados obtenidos muestran una disminución significativa en el fenotipo de adherencia de la cepa $\Delta invC \Delta grhD2$ en comparación con el de la cepa $\Delta invC$ (Figura 38A). Como era esperado, la mutante $\Delta invC \Delta ssrB$ no presentó un defecto en la adherencia, mientras que la mutante $\Delta invC \Delta siiE$ presentó una capacidad de adherirse a la células menor que la cepa $\Delta invC$ (Figura 38A). Para corroborar el resultado anterior, se construyó la cepa complementada $\Delta invC \Delta grhD2 + grhD2::FLAG-kan$, la cual presentó un fenotipo de adherencia similar al de la cepa $\Delta invC$ (Figura 38B).

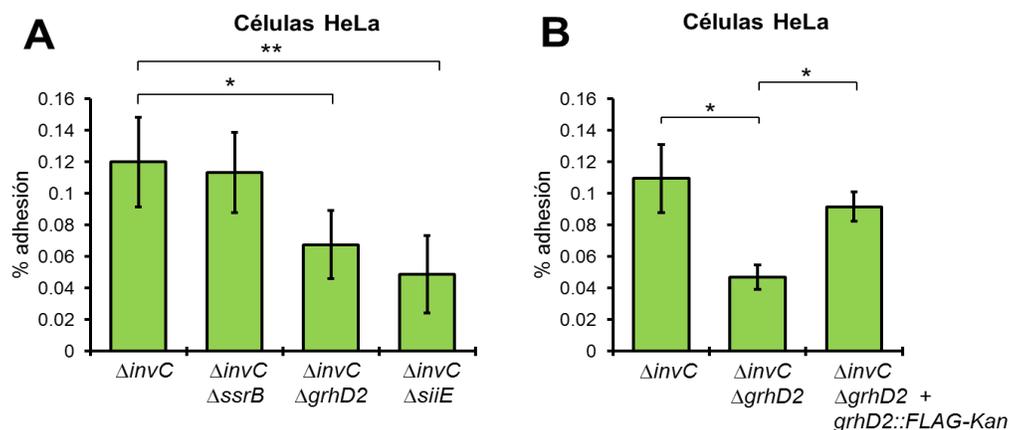


Figura 38. Se requiere de GrhD2 para la adherencia de *S. Typhimurium* a células HeLa. Se infectaron células HeLa con la cepa mutante $\Delta invC$ de *S. Typhimurium* SL1344, y las dobles mutantes $\Delta invC \Delta grhD2$, $\Delta invC \Delta ssrB$ y $\Delta invC \Delta siiE$ (A), así como con las cepas $\Delta invC$, $\Delta invC \Delta grhD2$ y la cepa complementada $\Delta invC \Delta grhD2 + grhD2::FLAG-kan$ (B), durante 30 min, posteriormente las monocapas de células se lavaron cuatro veces con PBS-1X para eliminar a las bacterias no adheridas. Después se lisaron las células y las bacterias adheridas se contabilizaron obteniendo las UFCs en cajas de LB agar. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$).

Estos resultados indican que la ausencia de *grhD2* disminuye la capacidad de *S. Typhimurium* de adherirse a células HeLa. Así, la disminución en la invasión que produce la ausencia de *grhD2* puede deberse a un defecto en la adherencia.

9.2.6. La ausencia de GrhD2 aumenta la replicación de *S. Typhimurium* dentro de macrófagos, no así en células HeLa

Asimismo, determinamos si *grhD2* se necesita para que *S. Typhimurium* pueda replicarse cuando se encuentra dentro células epiteliales y macrófagos. Para esto, se comparó el fenotipo de replicación en células HeLa y macrófagos RAW264.7 de la cepa WT y la mutante $\Delta grhD2$; asimismo, se analizó como control la cepa mutante $\Delta ssrB$. En estos ensayos se determinó la replicación de las cepas a las horas 4, 8 y 16 post-infección, así como la invasión, para calcular cuántas veces se incrementaba el número de bacterias en las diferentes horas con respecto a las que inicialmente invadieron. Los resultados obtenidos muestran que la mutante $\Delta grhD2$ presenta un fenotipo de replicación intracelular similar al de la

cepa WT en células HeLa (Figura 39A). Asimismo, en macrófagos su replicación intracelular también fue similar al de la WT, hasta la hora 8 post-infección; interesantemente, a la hora 16 la mutante $\Delta grhD2$ presentó un fenotipo de hiper-replicación, pues se replicó 2 veces más que la cepa WT (Figura 39B). Como esperábamos, la cepa $\Delta sssB$ presentó un fenotipo de replicación disminuido, el cual es más evidente en macrófagos (Figura 39A y B).

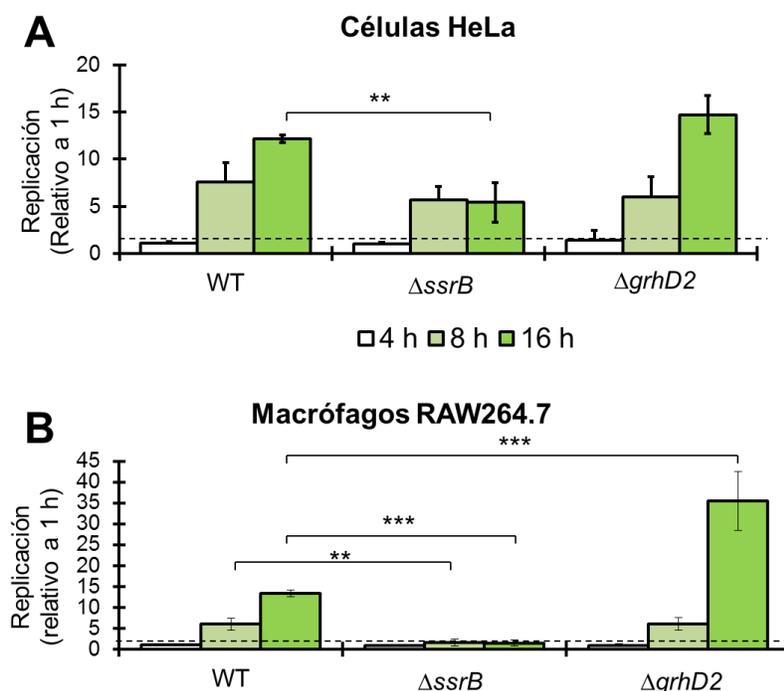


Figura 39. La ausencia de GrhD2 promueve una hiper-replicación de *S. Typhimurium* en macrófagos, no así en células HeLa. Se infectaron células HeLa (A) y macrófagos de ratón RAW264.7 (B) con la cepa WT de *S. Typhimurium* y sus mutantes isogénicas $\Delta grhD2$ y $\Delta sssB$ durante 15 min, posteriormente se cambió el medio DMEM por uno suplementado con gentamicina para matar a las bacterias extracelulares. Las UFCs intracelulares de cada cepa se determinaron a partir de lisados de células infectadas a las 1, 4, 8 y 16 h post-infección. La replicación se representa como las UFCs recuperadas a las horas indicadas divididas entre las UFCs recuperadas a 1 h post-infección para cada cepa. La línea punteada indica el valor de 1. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Estos resultados indican que no se requiere de GrhD2 para que *S. Typhimurium* se replique eficazmente dentro de células HeLa; sin embargo, su

ausencia promueve una mayor replicación intracelular en macrófagos RAW264.7 a un tiempo tardío post-infección.

Posteriormente, se evaluó si la cepa complementada $\Delta grhD2 + grhD2-FLAG-kan$ presentaba el mismo fenotipo de replicación que la cepa WT a las 16 h en macrófagos y en células HeLa. En macrófagos, donde la mutante $\Delta grhD2$ se replica alrededor de dos veces más que la cepa WT, se observó que la cepa complementada se replicó el mismo número de veces que la cepa WT (Figura 40A), mientras que en células HeLa, como se esperaba, todas las cepas evaluadas se replicaron igual número de veces (Figura 40B).

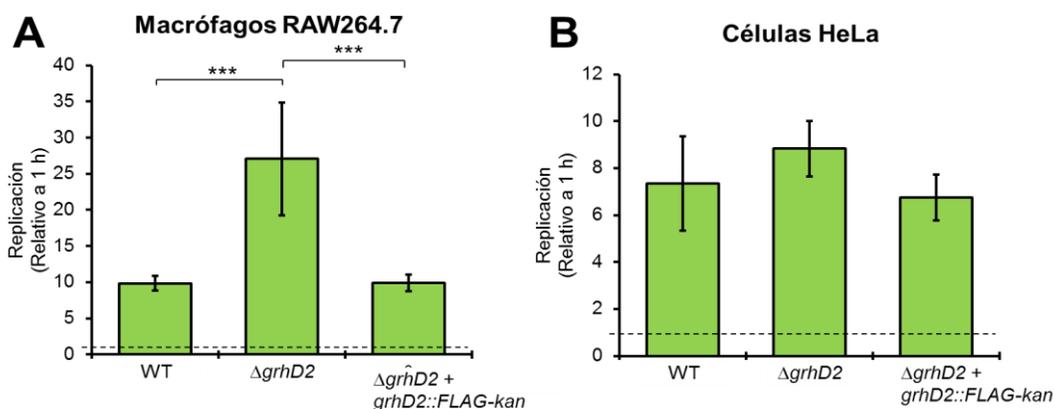


Figura 40. Se requiere de GrhD2 para el control de la replicación de *S. Typhimurium* en macrófagos. Se infectaron macrófagos RAW264.7 (A) y células HeLa (B) con la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y su cepa derivada mutante $\Delta grhD2$ así como con la cepa complementada $\Delta grhD2 + grhD2-FLAG-kan$, durante 15 min, posteriormente se cambió el medio DMEM por uno suplementado con gentamicina para matar a las bacterias extracelulares. La invasión y replicación fue medida contando las UFCs recuperadas a 1 h (invasión) y 16 h post-infección. La replicación se representa como las UFCs recuperadas a las 16 h divididas entre las UFCs recuperadas a 1 h. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes con respecto a la cepa WT (***, $p < 0.001$).

Con esto se corrobora que *grhD2*, además de requerirse en *S. Typhimurium* para la adherencia e invasión a células, contribuye también al adecuado control de la replicación de *S. Typhimurium* dentro de macrófagos, ya que en su ausencia se observa un fenotipo de hiper-replicación a las 16 h.

9.2.7. GrhD2 se requiere para la colonización intestinal de *S. Typhimurium* en ratones

La invasión de *Salmonella* a células epiteliales del intestino eventualmente conlleva al desarrollo de enterocolitis (Fabrega and Vila, 2013). Nuestros resultados muestran que GrhD2 es un factor necesario para la adherencia e invasión de *S. Typhimurium* a sus células hospederas, lo cual sugiere que este factor podría ser importante para que *Salmonella* pueda establecer una infección a nivel intestinal eficaz. Para determinar si GrhD2 es necesario para el establecimiento de la infección intestinal, se analizó la infección causada por la cepa WT de *S. Typhimurium*, su mutante $\Delta grhD2$ y la mutante complementada $\Delta grhD2 + grhD2-FLAG-kan$, en ratones pre-tratados con estreptomicina, el cual es utilizado como un modelo de colitis provocada por *S. Typhimurium* (Barthel *et al.*, 2003). Como control, se incluyó a la mutante $\Delta siiE$, que presenta también un fenotipo de adherencia disminuido. Los resultados preliminares mostraron que al llevar a cabo la cuantificación de UFCs en las heces de los ratones infectados, lo cual se tomó como indicador de la colonización intestinal, se recuperó un menor número de UFCs de la mutante $\Delta grhD2$, en comparación con la cepa WT, mientras que de la mutante complementada se obtuvo un número de UFCs similar al de la cepa WT (Figura 41). Como se esperaba, de la mutante $\Delta siiE$ se recuperó un número de UFCs menor que de la cepa WT (Figura 41). Estos resultados apoyan la conclusión de que GrhD2 está involucrado en la infección intestinal en ratones. Se evaluarán otros marcadores de colonización e inflamación intestinal para determinar un papel más específico para GrhD2 en este modelo de infección.

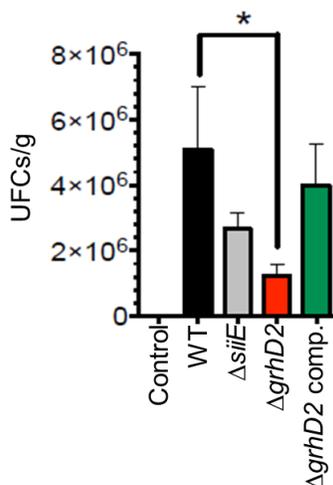


Figura 41. GrhD2 contribuye a la infección intestinal causada por *S. Typhimurium* en ratón. Ratones pre-tratados con estreptomicina fueron infectados con la cepa WT de *S. Typhimurium* o

las mutantes $\Delta grhD2$, $\Delta grhD2 + grhD2\text{-FLAG-kan}$ o $\Delta siiE$, o tratados con PBS 1X estéril (Control). Los ratones fueron sacrificados dos días después de ser infectados y el número de UFCs recuperadas por gramo de heces fueron calculados en cada ratón. Los datos son el promedio de cuatro animales diferentes. Las barras representan las desviaciones estándar. Los valores estadísticamente diferentes son indicados (* $p < 0.05$).

9.2.8. GrhD2 se secreta al medio de cultivo por *Salmonella* pero no por *E. coli* K-12

En *S. Typhimurium* *grhD2* codifica para una proteína de 79 aminoácidos, su estructura secundaria predicha muestra que forma una hélice α y seis hojas β (Figura 42).

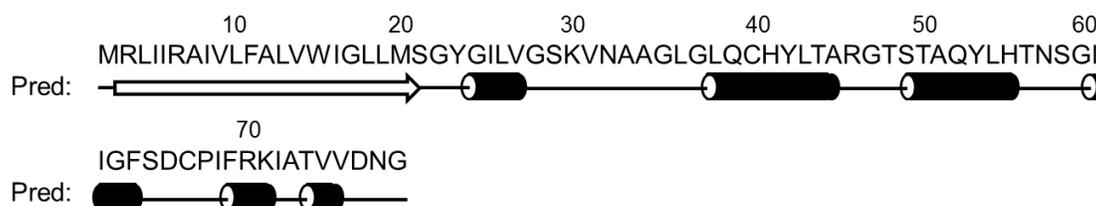


Figura 42. Estructura secundaria predicha para la proteína GrhD2. Secuencia de aminoácidos y predicción de la estructura secundaria de GrhD2. Las flechas y los cilindros indican las hojas β y hélices α predichas, respectivamente.

Para comenzar a elucidar la posible función de la proteína GrhD2, se decidió determinar si ésta se secreta. Para esto, se construyó el plásmido pK3-GrhD2-FLAG que expresa a la proteína GrhD2-FLAG a partir de un promotor constitutivo. Entonces, se evaluó la presencia de la proteína GrhD2-FLAG en el sobrenadante de cultivos de la cepa WT de *S. Typhimurium* que contiene el plásmido pK3-GrhD2-FLAG, crecidos en LB, mediante ensayos de Western blot. Como control de este experimento, se analizó también la presencia de esta proteína en extractos bacterianos totales de los mismos cultivos. La proteína GrhD2-FLAG fue detectada en el extracto total y en el sobrenadante, lo que indica que es secretada al medio de cultivo (Figura 43A). Entonces, para determinar si GrhD2 es secretada a través del SST3 de SPI-1 (SST3-1), se analizó si se secretaba en la cepa mutante $\Delta invC$, que no expresa un SST3 funcional, pues *InvC* es una ATPasa indispensable para el funcionamiento de este sistema (Moest and Méresse, 2013). En ausencia de *invC* también se pudo detectar a GrhD2-FLAG en el sobrenadante (Figura 43A), lo que indica que GrhD2 no es secretada

al medio de cultivo a través del SST3-1. Como control, se analizó la expresión y secreción de la proteína efectora AvrA (codificada en SPI-1 y secretada por el SST3-1) etiquetada con el epítipo 3XFLAG (Jones *et al.*, 2008). Como se esperaba, AvrA-FLAG fue secretada al medio de cultivo en la cepa WT pero no en la mutante $\Delta invC$ (Figura 43B).

S. Typhimurium cuenta con un segundo SST3, codificado en SPI-2 (SST3-2). Entonces, para definir si GrhD2 es secretada a través del SST3-2, se construyó la mutante $\Delta ssaV$, que no expresa un SST3-2 funcional, pues SsaV es indispensable para el ensamblaje de este sistema de secreción. En medio MM-N, condición donde se expresan los genes de SPI-2, se pudo detectar a GrhD2-FLAG en el sobrenadante de la cepa WT y de mutante $\Delta ssaV$ (Figura 43C), lo que indica que GrhD2 también se secreta en esta condición de crecimiento aunque no es a través del SST3-2. Como control, en estos experimentos se analizó la expresión y secreción del efector AvrA, que se ha reportado también se secreta a través del SST3-2 (Geddes *et al.*, 2005). Para estos experimentos se expresó a AvrA-FLAG constitutivamente a partir del plásmido pK3-AvrA-FLAG. Como se esperaba, la proteína AvrA-FLAG se secretó al medio de cultivo y debido a que en esta condición de crecimiento su secreción es a través del SST3-2, no se detectó en el sobrenadante de la mutante $\Delta ssaV$ (Figura 43D).

Posteriormente, para determinar si GrhD2-FLAG se secreta a través de un sistema de secreción global o específico de *Salmonella*, evaluamos su secreción en la cepa WT de *E. coli* MG1655 conteniendo el plásmido pK3-GrhD2-FLAG, crecida en LB. Experimentos de Western blot revelaron la presencia de GrhD2-FLAG en el extracto total de *E. coli*, pero no en el sobrenadante de los cultivos (Figura 43E), indicando que esta proteína sólo se puede secretar en *S. Typhimurium*.

Estos resultados indican que la proteína GrhD2 se secreta por un sistema presente o activo en *S. Typhimurium*, pero no en *E. coli* K-12. Asimismo, estos resultados muestran que la proteína GrhD2 se secreta por un sistema que está presente o es activo en *S. Typhimurium* crecida tanto en LB como en MM-N, y se descarta que su secreción sea a través de los sistemas SST3-1 y SST3-2.

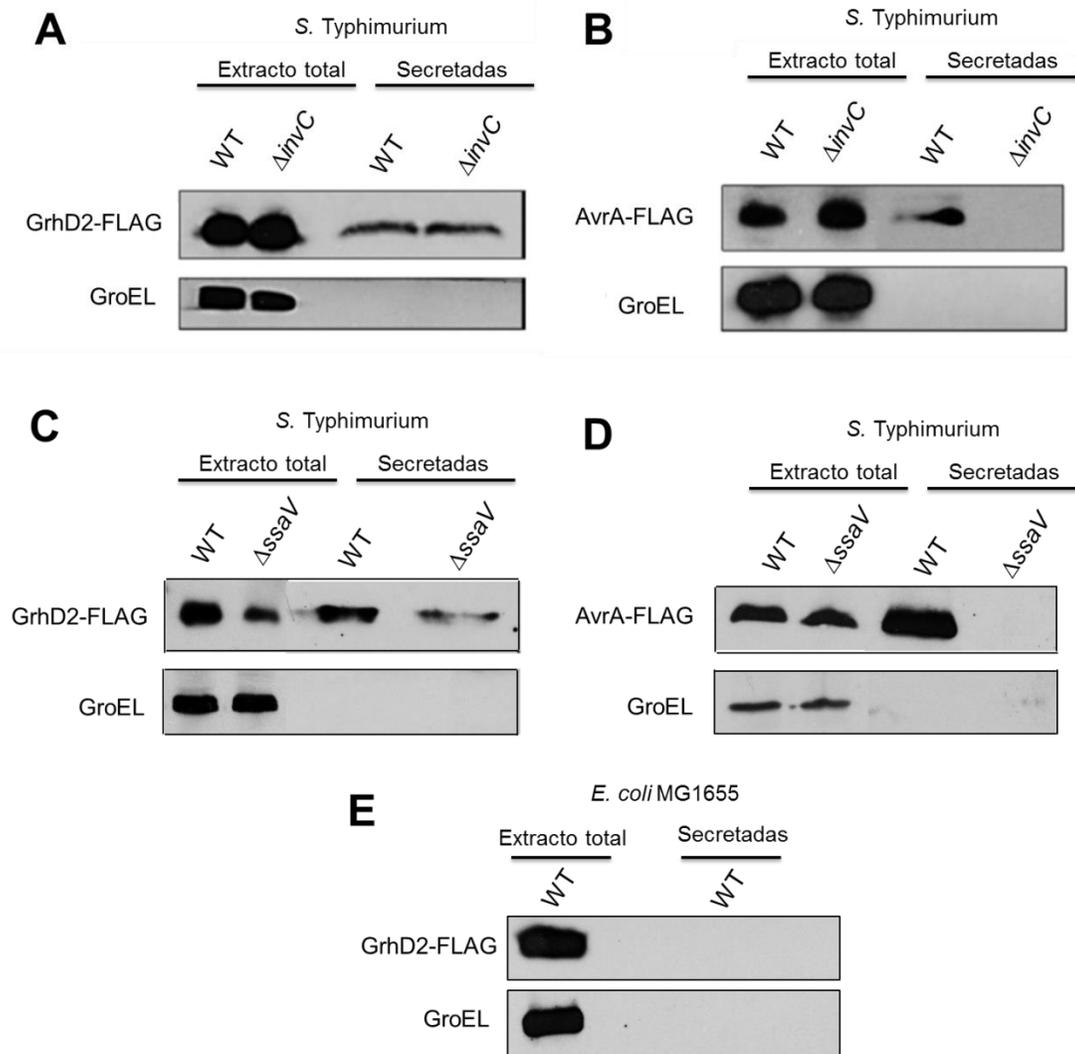


Figura 43. La proteína GrhD2 se secreta en *S. Typhimurium* de manera independiente a los SST3-1 y SST3-2, y no se secreta en *E. coli* K-12. Presencia de la proteína GrhD2-FLAG (**A**, **C**, **E**) o de la proteína AvrA-FLAG (**B**, **D**) en extractos totales o sobrenadantes de cultivos de las bacteria WT y $\Delta invC$ de *S. Typhimurium* crecidas en LB (**A**, **B**), de las bacterias WT y $\Delta ssaV$ de *S. Typhimurium* crecidas en MM-N (**C**, **D**), o de *E. coli* MG1655 crecida en LB (**E**). Todas la cepas que expresaron a GrhD2 contenían el plásmido pK3-GrhD2-FLAG que expresa constitutivamente esta proteína; en medio LB la expresión de AvrA-FLAG fue a partir del gen etiquetado en el cromosoma de las cepas evaluadas mientras que en medio MM-N su expresión fue a partir del plásmido pK3-AvrA-FLAG, que expresa constitutivamente a esta proteína. Las muestras fueron tomadas de cultivos crecidos durante 9 h en LB a 37°C. La presencia de GrhD2-FLAG y AvrA-FLAG se detectó mediante ensayos de Western blot, usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control, se detectó la presencia de GroEL, una proteína citoplásmica, usando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

Para investigar si la proteína homóloga de GrhD2 de *E. coli*, llamada YobH, también se secreta, ésta se etiquetó con el epítipo de 3XFLAG en la cepa *E. coli* MG1655. A partir de los respectivos genes cromosomales, YobH-FLAG se expresó a un nivel menor que GrhD2-FLAG, creciendo a las bacterias en LB (Figura 44A). Esto puede explicarse por la regulación positiva de la expresión de GrhD2 por HilD-SprB en *S. Typhimurium*. Llama la atención que YobH-FLAG mostró un tamaño significativamente mayor que GrhD2-FLAG, aún cuando el número de aminoácidos de las dos proteínas, deducido de los respectivos genes anotados, es igual. Para investigar si YobH-FLAG se secreta tanto en *E. coli* como en *S. Typhimurium*, se construyó el plásmido pK3-YobH-FLAG, el cual expresa a YobH-FLAG a partir de un promotor constitutivo. Entonces, se evaluó mediante Western blot la presencia de la proteína YobH-FLAG en extractos bacterianos totales y en el sobrenadante de cultivos de las cepas WT de *S. Typhimurium* y *E. coli* MG1655 que contienen el plásmido pK3-YobH-FLAG, crecidas en LB. La proteína YobH-FLAG fue detectada en el extracto total y en el sobrenadante en ambas bacterias (Figura 44B), lo que indica que es secretada al medio de cultivo tanto por *E. coli* como por *S. Typhimurium*.

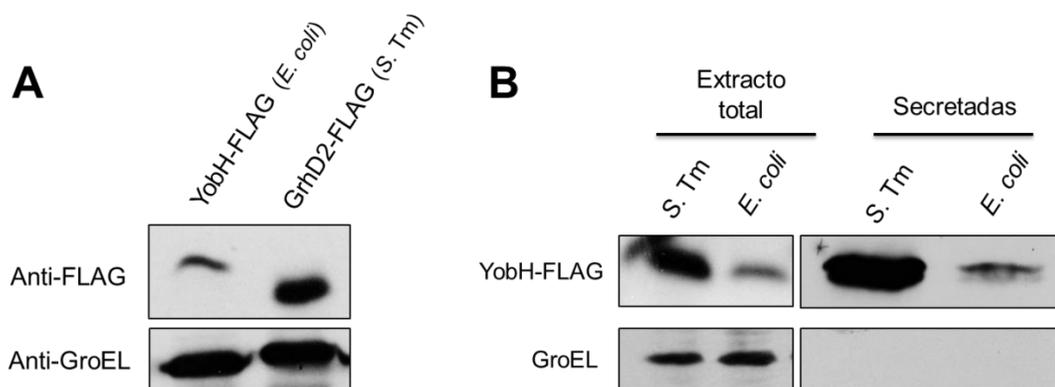


Figura 44. La proteína YobH de *E. coli* se secreta por *E. coli* K-12 y por *S. Typhimurium*. (A) Expresión de GrhD2-FLAG y YobH-FLAG (ortólogo de GrhD2) a partir de los respectivos genes cromosomales en *S. Typhimurium* y *E. coli* K12, creciendo a las bacterias en medio LB. (B) Presencia de la proteína YobH-FLAG en extractos totales o sobrenadantes de cultivos de las bacterias WT *S. Typhimurium* WT y *E. coli* MG1655, conteniendo el plásmido pK3-YobH-FLAG que expresa constitutivamente a YobH-FLAG, crecidas en medio LB. La presencia de GrhD2-FLAG y YobH-FLAG se detectó mediante ensayos de Western blot, usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Las muestras fueron tomadas de cultivos crecidos durante 9 h en LB. Como control, se detectó la presencia de GroEL, una proteína citoplásmica, usando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

Para continuar con la búsqueda del sistema de secreción por medio del cual la proteína GrhD2 es secretada en *S. Typhimurium*, se decidió evaluar la secreción de esta proteína en mutantes de los reguladores HilD, OmpR y FlhDC, debido a que estos están involucrados en la expresión de genes requeridos para diversas funciones en *Salmonella*, incluyendo los genes que codifican para los SST3-1, SST3-2 y el SST3 flagelar (el aparato flagelar es homólogo a los SST3), respectivamente (Fabrega and Vila, 2013). Se detectó a GrhD2-FLAG tanto en el extracto total como en el sobrenadante de los cultivos de las cepas que carecen de estos reguladores (Figura 45A). Como control, se analizó también la secreción de YobH-FLAG de *E. coli* en las mismas cepas de *S. Typhimurium*; YobH-FLAG también se secretó en todas las cepas evaluadas (Figura 45B). Con estos resultados se descarta algún papel de los genes regulados por HilD, OmpR y FlhDC en la secreción de GrhD2 en *S. Typhimurium*.

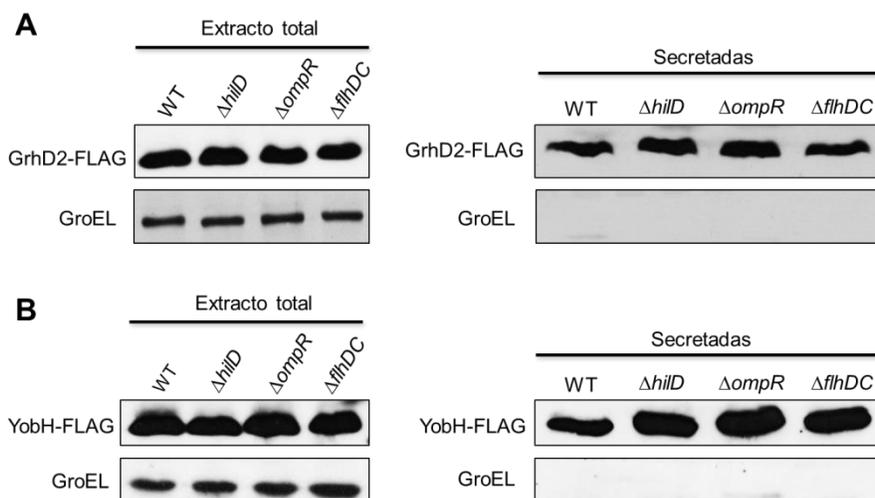


Figura 45. GrhD2 y YobH se secretan en ausencia de los reguladores HilD, OmpR o FlhDC. Presencia de la proteína GrhD2-FLAG (A) o de la proteína YobH-FLAG (B) en extractos totales o sobrenadantes de cultivos de las bacterias WT, $\Delta hilD$, $\Delta ompR$ y $\Delta flhDC$ de *S. Typhimurium* crecidas en LB; todas estas bacterias contenían el plásmido pK3-GrhD2-FLAG que expresa constitutivamente a GrhD2-FLAG o el plásmido pK3-YobH-FLAG que expresa constitutivamente a YobH-FLAG. La presencia de GrhD2-FLAG y YobH-FLAG se detectó mediante ensayos de Western blot, usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control, se detectó la presencia de GroEL, una proteína citoplásmica, usando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

El género *Salmonella* se divide en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. Debido a que los resultados anteriores muestran que GrhD2 se secreta en *S. Typhimurium* (serovariedad de *S. enterica*) y no en *E. coli* K-12, se decidió evaluar

si esta proteína se secreta a través de un sistema específico del género *Salmonella* o de la especie *S. enterica*. Para esto, se evaluó la secreción de GrhD2-FLAG en la cepa WT de *S. bongori* conteniendo el plásmido pK3-GrhD2-FLAG, crecida en LB. En estos experimentos también se analizó la secreción de YobH-FLAG a partir de su expresión del plásmido pK3-YobH-FLAG. Se detectó la presencia de GrhD2-FLAG y YobH-FLAG en el extracto total y en el sobrenadante de los cultivos de *S. bongori* (Figura 46). Estos resultados indican que la proteína GrhD2 probablemente se secreta por un sistema presente o activo en el género *Salmonella*, pero no en *E. coli* K-12, mientras que el sistema por el cual se secreta YobH debe estar presente o activo tanto en *Salmonella* como en *E. coli*.

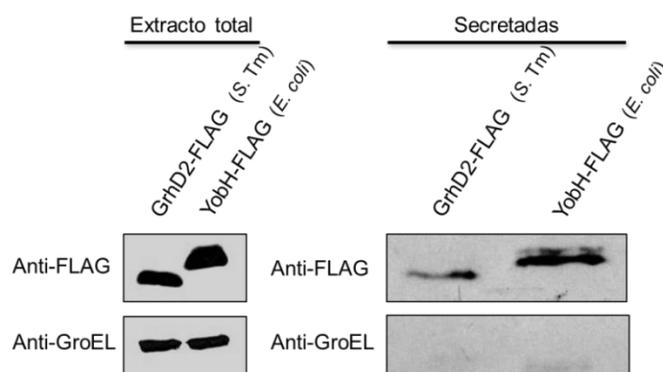


Figura 46. GrhD2 y YobH se secretan en *S. bongori*. Presencia de la proteína GrhD2-FLAG y de la proteína YobH-FLAG en extractos totales o sobrenadantes de cultivos de la cepa WT de *S. bongori* conteniendo el plásmido pK3-GrhD2-FLAG, el cual expresa constitutivamente a GrhD2-FLAG, o el plásmido pK3-YobH-FLAG que expresa constitutivamente a YobH-FLAG; los cultivos se crecieron en LB. La presencia de GrhD2-FLAG y YobH-FLAG se detectó mediante ensayos de Western blot, usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Como control, se detectó la presencia de GroEL, una proteína citoplásmica, usando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

9.2.9. La cascada reguladora HilD-SprB controla la expresión de los genes *slrP* y *ugtL*

Análisis previos por RNA-seq y ChIP-seq indican que HilD y SprB controlan positivamente la expresión de varios otros genes en común, además de *grhD2*, incluyendo a *slrP* y *ugtL* (Colgan *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2016), los cuales se han involucrado en la virulencia de *Salmonella* (Tsolis *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2004; Cordero-Alba *et al.*, 2016; Choi and Groisman, 2017; Goto *et al.*, 2017). La

regulación de *slrP* por HilD se ha confirmado anteriormente (Cordero-Alba and Ramos-Morales, 2014). Para conocer si HilD y SprB actúan en cascada en *slrP* y *ugtL*, se analizó la actividad de las fusiones transcripcionales *slrP-cat* y *ugtL-cat* en la cepa WT de *S. Typhimurium* y su mutante $\Delta hilD$ conteniendo el plásmido pK6-SprB o el vector pMPM-K6 Ω . Como control negativo, se analizó la fusión transcripcional *invF-cat*, HilD induce la expresión de *invF* a través de HilA (Bajaj *et al.*, 1995; Ellermeier and Slauch, 2007). La expresión de las tres fusiones analizadas disminuyó en la mutante $\Delta hilD$ con respecto a la cepa WT (Figura 47A-C). La expresión de SprB a partir del plásmido pK6-SprB indujo la actividad de las fusiones *slrP-cat* y *ugtL-cat*, pero no de la fusión *invF-cat*, en la mutante $\Delta hilD$ (Figura 47A-C). Esto indica que HilD controla la expresión de *slrP* y *ugtL* a través de SprB, lo cual corresponde con los datos del análisis por ChIP-seq que muestran unión de SprB, y no de HilD, en las regiones reguladoras de *slrP* y *ugtL*.

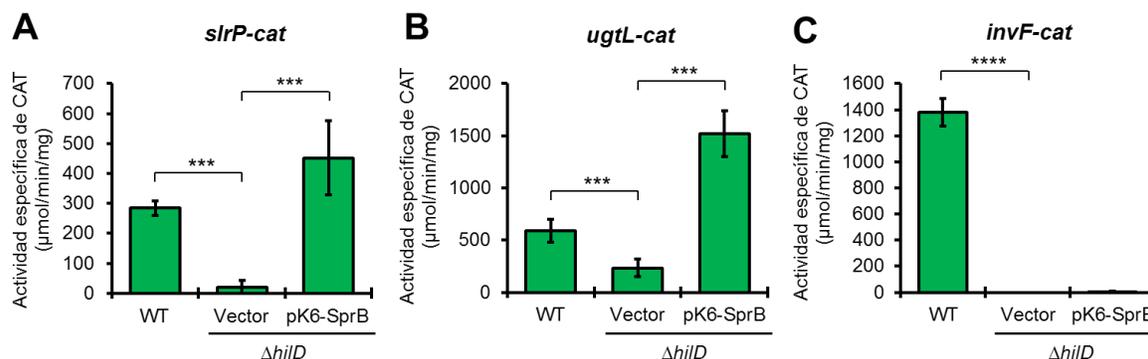


Figura 47. HilD regula a través de SprB la expresión de los genes *slrP* y *ugtL*. La expresión de las fusiones transcripcionales *sprB-cat* (A), *ugtL-cat* (B) e *invF-cat* (C), contenidas en los plásmidos pslrP-cat, pugtL-cat y pinvF-cat, respectivamente, se monitoreó en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y su mutante $\Delta hilD$ que lleva el vector pMPM-K6 Ω o el plásmido pK6-SprB. La expresión de SprB a partir del plásmido pK6-SprB fue inducida con 0.001% de L-arabinosa. La actividad específica de CAT fue determinada en muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos durante 9 h en medio LB a 37°C. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar. Se indican los valores estadísticamente diferentes (***, $p < 0.001$, ****, $p < 0.0001$).

Por lo tanto, nuestros resultados indican que la cascada de regulación formada por HilD y SprB, controla la expresión de un subconjunto de genes de virulencia de *Salmonella*, incluidos *grhD2*, *slrP* y *ugtL*.

10. DISCUSIÓN

La adquisición de nuevos genes a través de eventos de transferencia horizontal representa un paso fundamental en la evolución de la virulencia de *Salmonella* (Porwollik and McClelland, 2003). Para que estos genes se expresen en el momento y nicho adecuado, y así le confieran un beneficio a la bacteria, se han seleccionado diferentes mecanismos de regulación que involucran reguladores ancestrales y/o adquiridos (Ilyas *et al.*, 2017). HilD es un regulador transcripcional adquirido que controla la expresión de un gran número de genes de virulencia en *Salmonella*, la mayoría de los cuales están implicados en la invasión a células hospederas (Fabrega and Vila, 2013). El conocer más acerca de HilD, así como de los genes cuya expresión se controla por este regulador, permite identificar nuevos factores que son importantes para la virulencia de *Salmonella*. Nuestros resultados revelan dos genes adicionales de virulencia regulados por HilD, *grhD1*, el cual probablemente fue adquirido por transferencia horizontal, y *grhD2* que es un gen ancestral, pues su ortólogo *yobH* está presente en una región sinténica del genoma de *E. coli*. La expresión de *grhD1* requiere también del regulador PhoP, mientras que la de *grhD2* requiere del regulador SprB, pues en este caso HilD regula la expresión de *sprB* y la proteína SprB regula directamente a *grhD2*.

Cuando *S. Typhimurium* prolifera en condiciones que favorecen la expresión de los genes de SPI-1, y de otros genes requeridos para la invasión de *Salmonella* a las células hospederas, tanto HilD como PhoP controlan la expresión de *grhD1*. Nuestros resultados muestran que HilD y PhoP afectan de manera independiente los dos promotores localizados corriente arriba de *grhD1*; PhoP directamente y HilD a través de un factor adicional que queda por ser identificado. Adicionalmente, nuestros resultados también muestran que la proteína similar a histona H-NS reprime directamente la expresión de *grhD1*; H-NS silencia la expresión de muchos otros genes adquiridos en *Salmonella* (Lucchini *et al.*, 2006; Navarre, 2006). El modelo de regulación de la expresión de *grhD1* se esquematiza en la Figura 48.

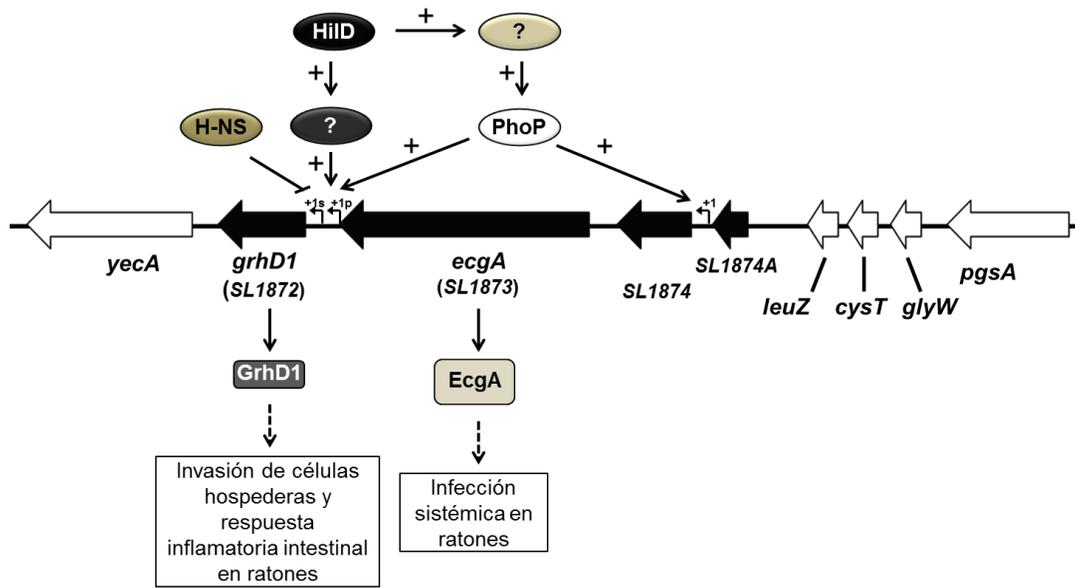


Figura 48. Modelo de regulación y papel del gen *grhD1* en la virulencia de *S. Typhimurium* SL1344. La participación de GrhD1 y EcgA en la virulencia de *S. Typhimurium*, así como la regulación de este proceso por HiiD, PhoP y H-NS son indicadas.

Existen otros casos donde HiiD y PhoP regulan de manera independiente la expresión de genes de virulencia de *Salmonella*. Por ejemplo, HiiD y PhoP también controlan positivamente y de manera independiente la expresión del operón *orgBC* de SPI-1, en condiciones de crecimiento que inducen la expresión de los genes de SPI-1; PhoP de manera directa y HiiD a través de HiiA (Aguirre *et al.*, 2006; Fabrega and Vila, 2013). Este operón codifica para OrgB y OrgC, una proteína citoplasmática requerida para la invasión y una proteína efectora secretada a través del SST3-1, respectivamente (Klein *et al.*, 2000; Day and Lee, 2003). De manera interesante, se ha reportado una regulación opuesta mediada por HiiD y PhoP para el gen *hilA*, que codifica para un regulador transcripcional de los genes de SPI-1 (Bajaj *et al.*, 1996; Schechter *et al.*, 1999; Schechter and Lee, 2001; Baxter and Jones, 2015). Adicionalmente, HiiD y PhoP regulan de manera positiva e independiente la expresión del gen *slrP*, en condiciones de crecimiento que inducen la expresión de los genes de SPI-1; PhoP directamente y HiiD a través de un mecanismo desconocido (Cordero-Alba and Ramos-Morales, 2014). El gen *slrP* codifica para una proteína efectora de virulencia que es translocada dentro de los macrófagos a través de los SST3-1 y SST3-2 (Miao and Miller, 2000). El solapamiento entre los regulones de HiiD y PhoP se extiende a varios otros genes, como se ha revelado por un análisis de transcriptoma (Colgan *et al.*, 2016)

y por otros resultados de nuestro grupo (Pérez-Morales D., datos no publicados). Es interesante que de acuerdo a nuestros resultados HilD regula positivamente la expresión de PhoP, y aunque ambos reguladores actúan de manera independiente sobre varios genes, también es posible que HilD regule a través de PhoP la expresión de otros genes, como lo muestran datos recientes de nuestro grupo (Pérez-Morales D., datos no publicados). Resultados de transcriptomas apoyan que HilD controla de manera positiva la expresión de PhoP (Colgan *et al.*, 2016).

Nuestros resultados muestran que HilD regula la expresión de *grhD1* a través de un factor que aún no hemos identificado. Los resultados obtenidos por transcriptomas indican que además de HilD, el regulador transcripcional Fur (del inglés, "Ferric uptake regulator") controla positivamente la expresión de *grhD1* en condiciones de crecimiento que inducen la expresión de los genes de SPI-1 (Colgan *et al.*, 2016). Se ha reportado que Fur regula la expresión de los genes de SPI-1 a través de HilD (Ellermeier and Slauch, 2008). Sin embargo, no existen reportes que indiquen que HilD regule la expresión de Fur, y que por lo tanto actúe a través de este regulador para inducir la expresión de otros genes. Asimismo, nuestros resultados indican que se requieren PhoP y SlyA para la expresión de *grhD1* en condiciones de crecimiento que inducen la expresión de los genes de SPI-1 y SPI-2, lo cual puede ser explicado por la regulación positiva recíproca entre PhoP y SlyA que se ha demostrado en *Salmonella* (Norte *et al.*, 2003; Navarre *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008). Sin embargo, datos obtenidos recientemente en nuestro grupo indican que HilD regula positivamente la expresión de SlyA en medio LB (Zavala-Alvarado C., datos no publicados). Se ha reportado que SlyA puede actuar como anti-represor de H-NS para inducir la expresión de sus genes blancos (Perez *et al.*, 2008). Nuestros resultados muestran que H-NS reprime directamente la expresión de *grhD1* e indican que el regulador que no hemos identificado actuaría como anti-represor de H-NS para inducir la expresión de este gen, ya que al inactivar la función de H-NS no se requiere de la regulación positiva mediada por HilD. Por lo tanto, es posible que HilD actúe a través de SlyA para inducir la expresión de *grhD1*, aunque esto queda por definirse. PhoP no actúa desreprimiendo la represión de H-NS, por lo que queda descartado como el regulador mediante el cual HilD afecta la expresión de *grhD1*.

Durante el crecimiento de *S. Typhimurium* en medio mínimo, en donde se favorece la expresión de los genes de SPI-2 y de otros genes requeridos para la replicación de *Salmonella* dentro de sus células hospederas, se requiere de PhoP pero no de HilD para la expresión de *grhD1*. En condiciones de crecimiento que inducen la expresión de los genes de SPI-2, PhoP también regula de manera positiva la expresión del operón *orgBC* y del gen *slrP*, independientemente de HilD (Aguirre *et al.*, 2006; Thijs *et al.*, 2007). Además de PhoP y SlyA, posiblemente otros reguladores estén involucrados en la expresión de *grhD1* en condiciones inductoras de la expresión de SPI-2, como se mostró en los resultados de un análisis de transcriptomas (Colgan *et al.*, 2016) y confirmado por nuestros resultados. PhoP y SlyA inducen la expresión de genes de virulencia cuando *Salmonella* se encuentra dentro de sus células hospederas (Fabrega and Vila, 2013); el gen *grhD1* se expresa dentro de los macrófagos (Eriksson *et al.*, 2003; Srikumar *et al.*, 2015). Nuestros resultados indican que el gen *grhD1* no es necesario para la replicación de *S. Typhimurium* dentro de células HeLa y de macrófagos de ratón RAW264.7. Además, nuestros resultados muestran que *grhD1* tampoco se necesita para la colonización del bazo en ratones pre-tratados con estreptomycin, lo cual sugiere que este gen no está involucrado en la infección sistémica causada por *S. Typhimurium*. Además de regular a *grhD1*, PhoP controla positivamente la expresión del operón *ecgA-SL1874*, localizado cerca de *grhD1* en la misma isla genómica; este operón codifica para EcgA, una endopeptidasa que contribuye para la infección sistémica en ratones, pero que no se requiere para la invasión o replicación dentro de células HeLa de *S. Typhimurium* (Rico-Pérez *et al.*, 2016).

En cuanto al mecanismo de regulación que definimos para la expresión del segundo gen analizado en este trabajo, *grhD2*, nuestros resultados muestran que cuando *S. Typhimurium* crece en condiciones que inducen la expresión de los genes de SPI-1, HilD regula a través de SprB la expresión de *grhD2*. Nuestros resultados demuestran que HilD controla de manera positiva la expresión de *sprB* al desplazar a H-NS de la región reguladora de este gen; HilD induce la expresión de otros genes blanco por un mecanismo similar (Schechter *et al.*, 1999; Schechter and Lee, 2001; Martínez *et al.*, 2014). El modelo de regulación de la expresión de *grhD2* se esquematiza en la Figura 49.

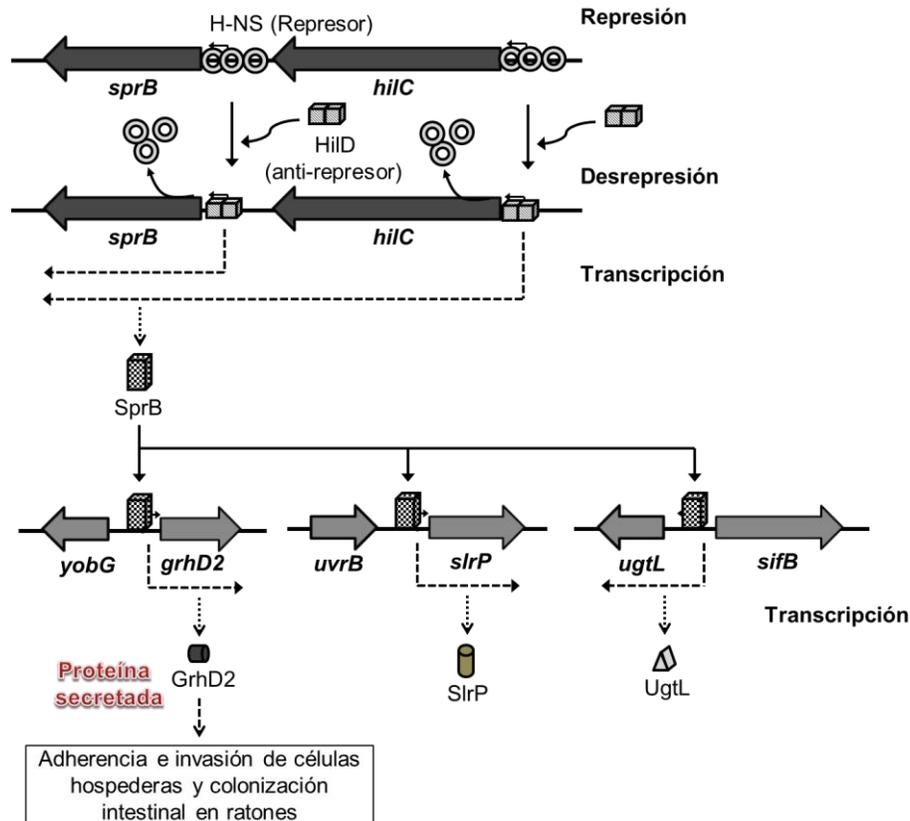


Figura 49. Modelo de regulación y papel del gen *grhD2* en la virulencia de *S. Typhimurium* SL1344. El papel de GrhD2 en el proceso de virulencia, así como su regulación a través de la cascada HiID-SprB son indicadas. Otros genes de virulencia (*slrP* y *ugtL*) también son regulados a través de esta cascada de regulación.

Anteriormente se había reportado que HiID estaría regulando la expresión de *sprB*, actuando directamente sobre el promotor localizado corriente arriba de *hilC*, gen que se encuentra adyacente a *sprB* en SPI-1, generándose así el transcrito *hilC-sprB* (Smith *et al.*, 2016). Nuestros resultados demuestran que HiID es capaz de inducir la expresión de *sprB* actuando directamente sobre la región reguladora corriente arriba de este gen. En conjunto, estos resultados indican que la expresión de *sprB* puede ser controlada por la acción de HiID sobre dos regiones reguladoras diferentes, la que se encuentra corriente arriba de *hilC* y la localizada corriente arriba de *sprB*. Adicional a la regulación vista sobre *grhD2*, pudimos comprobar que la cascada de regulación formada por HiID y SprB controla la expresión de los genes *slrP* y *ugtL*, los cuales han sido involucrados en la virulencia de *Salmonella* (Tsolis *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 2004; Cordero-Alba *et al.*, 2016; Choi and Groisman, 2017; Goto *et al.*, 2017). Por lo tanto, esta cascada de

regulación representa una vía adicional por medio de la cual HilD puede inducir la expresión de algunos genes requeridos para la invasión o para otras funciones involucradas en la virulencia de esta enterobacteria. Cabe mencionar que la cascada de regulación HilD-SprB no se había descrito anteriormente, y es de interés en nuestro grupo continuar con la búsqueda de más genes controlados por esta cascada.

Debido a los pocos blancos directos reportados para SprB y a los pocos estudios que existen sobre este regulador, hasta el momento se desconoce el mecanismo de acción de SprB para controlar la expresión de sus genes blancos. Para el caso de *grhD2*, pudimos descartar que H-NS regule la expresión de este gen, y por lo tanto, en este caso SprB no tendría un papel de anti-represor de H-NS. Resultados preliminares de nuestro grupo sugieren que SprB actúa como activador clásico en *grhD2*, favoreciendo la interacción de la RNA polimerasa sobre el promotor de este gen (Valdespino-Díaz M., datos no publicados).

Otro de los objetivos de este trabajo fue determinar si los genes *grhD1* y *grhD2* podrían estar involucrados en la virulencia de *Salmonella*. Los resultados de este trabajo demuestran que GrhD1 se requiere para la invasión de *S. Typhimurium* a sus células hospederas. Es interesante que encontramos que tanto la ausencia como la sobre-expresión de GrhD1 disminuye el fenotipo de invasión. Consecuentemente, también mostramos que GrhD1 está involucrada en la respuesta inflamatoria intestinal inducida por *S. Typhimurium* en ratones pre-tratados con estreptomicina (Figura 48). Muchos otros genes regulados por HilD y que se requieren para la invasión de las células hospederas, como los genes de SPI-1, también contribuyen a la inducción de esta respuesta inflamatoria intestinal (Hapfelmeier *et al.*, 2005; Coburn *et al.*, 2005; Coombes *et al.*, 2005; Fabrega and Vila, 2013). Nuestros resultados indican que GrhD1 no se secreta cuando *S. Typhimurium* crece en condiciones inductoras de la expresión de los genes de SPI-1; por otra parte, la ausencia de GrhD1 no afecta el perfil típico de proteínas secretadas a través de SPI-1 o tiene un efecto significativo en la movilidad, los cuales son factores involucrados en la invasión de *Salmonella* a sus células hospederas. Por lo tanto, el papel específico de GrhD1 en la invasión queda aún por ser determinado.

Para el caso de GrhD2, determinamos que esta proteína se requiere para la adherencia e invasión de *S. Typhimurium* a sus células hospederas (Figura 49). El defecto visto en invasión puede ser resultado del fenotipo de adherencia

disminuido. Nuestros resultados preliminares muestran que se requiere de GrhD2 para la colonización intestinal de *S. Typhimurium* en ratones pre-tratados con estreptomicina (Figura 49). Sin embargo, queda por definir si al igual que GrhD1, GrhD2 puede estar implicado en la respuesta inflamatoria intestinal o si participa en otra respuesta desencadenada durante la infección por *Salmonella*. Cabe mencionar que en este estudio se decidió utilizar el modelo del ratón para evaluar la infección intestinal producida por *S. Typhimurium*, debido al fenotipo de invasión disminuido que se obtuvo en ausencia de GrhD1 y GrhD2, que nos sugería que estos factores podrían ser importantes para que la bacteria pudiera establecer una infección eficaz a nivel intestinal. Aunque el modelo del ratón pre-tratado con estreptomicina es actualmente el más empleado en el estudio de la infección intestinal causada por *Salmonella*, debido a que se producen signos similares a los de la gastroenteritis producida en humanos por *S. Typhimurium*, existen otros modelos animales que se han empleado exitosamente para evaluar la infección intestinal por *Salmonella*, como el de pollos, bovinos y cerdos (Aabo *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2001; Tsolis *et al.*, 2011). Por lo tanto, aunque en este estudio solo se utilizó el modelo del ratón, nuestros resultados podrían ser corroborados y ampliados usando otros modelos animales.

De manera sorprendente, al evaluar el efecto de GrhD2 en la replicación de *Salmonella* en células en cultivo, encontramos que la ausencia de esta proteína causa un fenotipo de hiper-replicación cuando *Salmonella* se encuentra en macrófagos en cultivo. Existen reportes contradictorios en cuanto a la expresión de *grhD2* dentro de macrófagos, en un estudio previo de análisis de transcriptomas mediante microarreglos, se encontró que *grhD2* se expresa dentro de los macrófagos a un nivel similar que en un medio de cultivo rico en nutrientes (Eriksson *et al.*, 2003), condición de crecimiento que asemeja el ambiente del lumen intestinal. En contraste, en un estudio de transcriptomas mediante RNAseq, se encontró que la expresión de *grhD2* disminuye dentro de los macrófagos en comparación con la que alcanza en un medio de cultivo rico en nutrientes (Srikumar *et al.*, 2015). Nuestros datos indican que *grhD2* se expresa de manera similar en medio rico y en medio mínimo, esta última condición de crecimiento considerada similar al ambiente intracelular de los macrófagos. Con base en estos resultados, y al requerimiento de GrhD2 para un adecuado control de la replicación, esperaríamos que GrhD2 sí se expresara dentro de los macrófagos. Cabe mencionar que el efecto de GrhD2 sobre la replicación de *S. Typhimurium* se observó solo en macrófagos, no en células HeLa. Así, GrhD2

estaría teniendo una función específica dentro de macrófagos, que sería controlar la tasa de replicación de *Salmonella*, lo cual es importante para evitar una sobrepoblación de bacterias que pudiera desencadenar, entre otras cosas, una respuesta inmune que conlleve a la muerte de los macrófagos, lo que impediría que *Salmonella* fuera capaz de diseminarse. Cómo es que GrhD2 modula la replicación de *Salmonella* es un aspecto que queda por definir.

En otros estudios se han reportado factores de *Salmonella* que permiten controlar la replicación intracelular de esta bacteria en diferentes tipos celulares (Tierrez and García-del Portillo, 2005). Previamente se identificó y reportó que una proteína codificada en SPI-6, SciS, reportada como una proteína de membrana con un péptido señal en su dominio N-terminal (Folkesson *et al.*, 2002), limita la replicación intracelular de *Salmonella* en macrófagos, en un estado tardío de la infección y que además, atenúa la virulencia de *S. Typhimurium* en el ratón, pues en ausencia de este factor la bacteria es hipervirulenta en ese modelo animal (Parsons and Heffron, 2005). Previo a este reporte, se había determinado que una mutante de SPI-6 presenta un fenotipo de invasión disminuido en células eucariotes en cultivo (Folkesson *et al.*, 2002); sin embargo, no se ha reportado el fenotipo de invasión de una mutante de *sciS*. También se ha reportado que en fibroblastos una cepa que carece del regulador PhoP presenta un fenotipo de hiper-replicación, lo que indica que PhoP controla la replicación de *Salmonella* en fibroblastos (Cano *et al.*, 2001; Núñez-Hernández *et al.*, 2013), contrario a lo que se ha reportado para macrófagos, donde es un factor que promueve la replicación de *Salmonella* (Fabrega and Vila, 2013). De manera interesante se encontró que dentro de los fibroblastos la proteína codificada en SPI-6, PagN, se sobre-expresa (Núñez-Hernández *et al.*, 2013). PagN es una proteína de membrana externa que le sirve a *Salmonella* para adherirse e invadir a células de su hospedero y su expresión es regulada por PhoP (Lambert and Smith, 2008; Lambert and Smith, 2009). Núñez-Hernández y cols., proponen que PagN podría estar involucrada en la regulación mediada por PhoP sobre la replicación de *Salmonella* dentro de fibroblastos. Aunque no se ha podido definir un mecanismo por medio del cual todos estos factores estén modulando la replicación de *Salmonella*, se ha visto que este control es importante para la permanencia de la bacteria dentro de sus células hospederas, y por lo tanto, para su virulencia.

GrhD2 posee un dominio transmembranal en su extremo amino-terminal, y nuestros resultados demuestran que es una proteína que se secreta cuando

Salmonella crece en medio rico y mínimo, aunque nuestros resultados descartan que su secreción sea a través de los SST3 activos en esas condiciones de crecimiento, o a través de algún sistema regulado por HilD, OmpR o FlhDC. Es interesante que GrhD2 se secreta exclusivamente en bacterias del género *Salmonella*; a diferencia de YobH, su proteína ortóloga de *E. coli* que puede secretarse en *E. coli* y *Salmonella*. YobH es una proteína cuya función tampoco se ha caracterizado en *E. coli* y tiene 73% de identidad con GrhD2 de *S. Typhimurium*; YobH también contiene un posible dominio transmembranal, en la misma región que GrhD2. De acuerdo a los datos obtenidos hasta el momento, el sistema por el cual se secreta GrhD2 debe estar activo en *Salmonella* en las condiciones de crecimiento probadas. Además de los SST3, *S. Typhimurium* cuenta con el SST6 codificado en SPI-6; sin embargo, se ha reportado que este sistema no es activo en las condiciones de crecimiento que nosotros probamos (Brunet *et al.*, 2015). Por lo tanto, queda por identificar el sistema por el cual se secreta GrhD2. Aunque aún no conocemos la función específica de GrhD2, los resultados obtenidos nos permiten especular que esta proteína podría ser translocada a la membrana de las células hospederas, para así actuar como un factor que promueve la adherencia de *Salmonella* y que evita la hiper-replicación de *Salmonella* dentro de los macrófagos.

En conjunto, los resultados obtenidos sobre la secreción de GrhD2 y YobH nos indican que se generó una especialización para la secreción de GrhD2 en *Salmonella*. Además, nuestros resultados indican que en *S. Typhimurium* se adaptó la regulación de *grhD2* por HilD y SprB, para la expresión de este gen en condiciones de crecimiento que favorecen la expresión de varios otros genes de virulencia. Probablemente, ambas cosas, la adaptación o especialización de la secreción y de la regulación de la expresión de GrhD2, contribuyeron para que en *S. Typhimurium* GrhD2 sea un factor de virulencia. Si YobH (el ortólogo de GrhD2 de *E. coli*) es capaz de reemplazar la función de GrhD2 en *S. Typhimurium*, es algo que se está estudiando en nuestro grupo.

En resumen, los hallazgos de este trabajo complementan la información que se tenía sobre los regulones de HilD, PhoP, SprB y SlyA. Adicionalmente, se aportan evidencias sobre el sobrelape entre estos regulones y se revela una nueva cascada de regulación por la cual HilD induce la expresión de genes de virulencia. Lo más importante de todas estas evidencias es que permitieron identificar dos nuevos factores de virulencia de *Salmonella*, GrhD1 y GrhD2.

11. CONCLUSIONES

grhD1 (SL1872)

- ❖ Para la expresión del gen *grhD1* se requiere de HilD y PhoP en medio LB, los cuales actúan de manera independiente. Sólo se requiere de PhoP en medio mínimo.
- ❖ El gen *grhD1* tiene dos promotores funcionales en LB.
- ❖ H-NS reprime directamente la expresión de *grhD1*.
- ❖ La ausencia de GrhD1 o su sobre-expresión afecta la capacidad de *S. Typhimurium* para invadir eficazmente células epiteliales HeLa, macrófagos y fibroblastos.
- ❖ No se requiere de GrhD1 para que *S. Typhimurium* se replique intracelularmente en células epiteliales HeLa y macrófagos.
- ❖ GrhD1 contribuye a la respuesta inflamatoria intestinal producida por la infección de *S. Typhimurium* en ratón.
- ❖ GrhD1 no se secreta, y su ausencia no afecta la secreción de proteínas de SPI-1, así como tampoco tiene un efecto en la motilidad de *S. Typhimurium*.
- ❖ HilD regula indirectamente de manera positiva la expresión de *phoP*.

grhD2 (SL1770)

- ❖ HilD regula positivamente la expresión del gen *grhD2* a través de SprB.
- ❖ La cascada de regulación HilD-SprB induce la expresión de *slrP* y *ugtL*.
- ❖ H-NS no controla la expresión de *grhD2*.
- ❖ La ausencia de GrhD2 afecta la capacidad de *S. Typhimurium* para invadir eficazmente células epiteliales HeLa y macrófagos.
- ❖ La ausencia de GrhD2 afecta la capacidad de *S. Typhimurium* para adherirse a células HeLa.
- ❖ La ausencia de GrhD2 incrementa la replicación de *S. Typhimurium* en macrófagos a las 16 h post-infección. Sin embargo, en células HeLa esto no ocurre.

- ❖ GrhD2 contribuye a la infección intestinal causada por *S. Typhimurium* en ratón.
- ❖ GrhD2 es una proteína que se secreta específicamente en *Salmonella* de manera independiente a los SST3 de SPI-1 o SPI-2. Este proceso no ocurre en *E. coli* K-12.
- ❖ En medio LB, YobH (proteína ortóloga de GrhD2) de *E. coli* se expresa de manera limitada en *S. Typhimurium*.
- ❖ YobH es secretada tanto en *E. coli* K-12 como en *Salmonella*.

11. PERSPECTIVAS

- ❖ Identificar el regulador intermediario involucrado en la regulación positiva de *grhD1* por parte de HiID.
- ❖ Determinar la localización subcelular de GrhD1 en *S. Typhimurium*.
- ❖ Definir el sistema de secreción a través del cual GrhD2 se secreta en *S. Typhimurium* así como el correspondiente a YobH en *E. coli*.
- ❖ Determinar si GrhD2 se transloca a las células hospederas.
- ❖ Identificar posibles factores de *S. Typhimurium* o de células hospederas que interaccionen con GrhD1 o GrhD2.
- ❖ Determinar el papel de GrhD1 y GrhD2 en el proceso de infección de *S. Typhimurium* a otros hospederos.
- ❖ Definir el mecanismo por el cual SprB regula a sus genes blanco.

12. REFERENCIAS

- Aabo, S., Christensen, J.P., Chadfield, M.S., Carstensen, B., Jensen, T.K., Bisgaard, M., and Olsen, J.E.** (2000) Development of an *in vivo* model for study of intestinal invasion by *Salmonella enterica* in chickens. *Infect Immun* 68: 7122–5.
- Aguirre, A., Cabeza, M.L., Spinelli, S. V, McClelland, M., García Véscovi, E., and Soncini, F.C.** (2006) PhoP-induced genes within *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol* 188: 6889–98.
- Aiastui, A., Pucciarelli, M.G., and García-del Portillo, F.** (2010) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invades fibroblasts by multiple routes differing from the entry into epithelial cells. *Infect Immun* 78: 2700–13.
- Altier, C.** (2005) Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* 43: 85–92.
- Asten, A.J.A.M., and Dijk, J.E.** (2005) Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44: 251–259.
- Bajaj, V., Hwang, C., and Lee, C.A.** (1995) *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol Microbiol* 18: 715–727.
- Bajaj, V., Lucas, R.L., Hwang, C., and Lee, C.A.** (1996) Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol* 22: 703–714.
- Banda, M.M., López, C., Manzo, R., Rico-Pérez, G., García, P., Rosales-Reyes, R., et al.** (2018) HilD and PhoP independently regulate the expression of *grhD1*, a novel gene required for *Salmonella* Typhimurium invasion of host cells. *Sci Rep* 8: 4841.
- Banda, M.M., Zavala-Alvarado, C., Pérez-Morales, D., and Bustamante, V.H.** (2019) SlyA and HilD Counteract H-NS-Mediated Repression on the *ssrAB* Virulence Operon of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Thus Promote Its Activation by OmpR. *J Bacteriol* 201: e00530-18.
- Barthel, M., Hapfelmeier, S., Quintanilla-Martínez, L., Kremer, M., Rohde, M., Hogardt, M., et al.** (2003) Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun* 71: 2839–58.
- Bäumler, A.J., Winter, S.E., Thiennimitr, P., and Casadesús, J.** (2011) Intestinal and chronic infections: *Salmonella* lifestyles in hostile environments. *Environ Microbiol Rep* 3: 508–517.
- 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: 1295–305.
- 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: 978–85.
- Bijlsma, J.J.E., and Groisman, E.A.** (2005) The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 57: 85–96.
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., and Swaminathan, B.** (2000) *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol* 38: 2465–7.
- Brosius, J.** (1984) Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene* 27: 151–160.

- Brunet, Y.R., Khodr, A., Logger, L., Aussel, L., Mignot, T., Rimsky, S., and Cascales, E.** (2015) H-NS Silencing of the *Salmonella* Pathogenicity Island 6-Encoded Type VI Secretion System Limits *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Interbacterial Killing. *Infect Immun* 83: 2738–2750.
- 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: 14591–6.
- Bustamante, V.H., Villalba, M.I., García-Angulo, V.A., Vázquez, A., Martínez, L.C., Jiménez, R., and Puente, J.L.** (2011) PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 82: 398–415.
- Cano, D.A., Martínez-Moya, M., Pucciarelli, M.G., Groisman, E.A., Casadesús, J., and Portillo, F.G.-D.** (2001) *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Response Involved in Attenuation of Pathogen Intracellular Proliferation. *Infect Immun* 69: 6463–6474 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553591>. Accessed March 24, 2019.
- Castelli, M.E., García Vescovi, E., and Soncini, F.C.** (2000) The phosphatase activity is the target for Mg²⁺ regulation of the sensor protein PhoQ in *Salmonella*. *J Biol Chem* 275: 22948–54.
- Choi, J., and Groisman, E.A.** (2017) Activation of master virulence regulator PhoP in acidic pH requires the *Salmonella*-specific protein UgtL. *Sci Signal* 10: eaan6284.
- Cirillo, D.M., Valdivia, R.H., Monack, D.M., and Falkow, S.** (1998) Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* 30: 175–188.
- Coburn, B., Grassl, G.A., and Finlay, B.B.** (2007) *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol* 85: 112–118.
- Coburn, B., Li, Y., Owen, D., Vallance, B.A., and Finlay, B.B.** (2005) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* 73: 3219–27.
- Colgan, A.M., Kröger, C., Diard, M., Hardt, W.-D., Puente, J.L., Sivasankaran, S.K., et al.** (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.
- Coombes, B.K., Coburn, B.A., Potter, A.A., Gomis, S., Mirakhur, K., Li, Y., and Finlay, B.B.** (2005) Analysis of the contribution of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine ileal loop model and a murine model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* 73: 7161–9.
- Cordero-Alba, M., García-Gómez, J.J., Aguilera-Herce, J., and Ramos-Morales, F.** (2016) Proteomic insight into the effects of the *Salmonella* ubiquitin ligase SlrP on host cells. *Biochem Biophys Res Commun* 472: 539–544.
- 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: 3912–22.
- Costa, T.R.D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M.S., Redzej, A., Trokter, M., and Waksman, G.** (2015) Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* 13: 343–359.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L.** (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640–5.
- Day, J.B., and Lee, C.A.** (2003) Secretion of the *orgC* gene product by *Salmonella enterica* serovar

Typhimurium. *Infect Immun* 71: 6680–5.

Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S., and Hensel, M. (1999) Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol* 31: 1759–73.

Desai, P.T., Porwollik, S., Long, F., Cheng, P., Wollam, A., Bhonagiri-Palsikar, V., et al. (2013) Evolutionary Genomics of *Salmonella enterica* Subspecies. *MBio* 4: e00579-12.

Dillon, S.C., and Dorman, C.J. (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol* 8: 185–195.

Drecktrah, D., Knodler, L.A., Ireland, R., and Steele-Mortimer, O. (2006) The Mechanism of *Salmonella* Entry Determines the Vacuolar Environment and Intracellular Gene Expression. *Traffic* 7: 39–51.

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.

Eichelberg, K., Hardt, W.-D., and Galan, J.E. (1999) Characterization of SprA, an AraC-like transcriptional regulator encoded within the *Salmonella typhimurium* pathogenicity island 1. *Mol Microbiol* 33: 139–152.

Ellermeier, C.D., Ellermeier, J.R., and Slauch, J.M. (2005) HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 57: 691–705.

Ellermeier, J.R., and Slauch, J.M. (2007) Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol* 10: 24–9.

Ellermeier, J.R., and Slauch, J.M. (2008) Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. *J Bacteriol* 190: 476–86.

Eng, S.-K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.-S., Ser, H.-L., Chan, K.-G., and Lee, L.-H. (2015) *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front Life Sci* 8: 284–293.

Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M., and Hinton, J.C.D. (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 47: 103–18.

Ernst, R.K., Guina, T., and Miller, S.I. (2001) *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes Infect* 3: 1327–1334.

Fabrega, A., and Vila, J. (2013) *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. *Clin Microbiol Rev* 26: 308–341.

Fass, E., and Groisman, E.A. (2009) Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol* 12: 199–204.

Ferenci, T., Zhou, Z., Betteridge, T., Ren, Y., Liu, Y., Feng, L., et al. (2009) Genomic sequencing reveals regulatory mutations and recombinational events in the widely used MC4100 lineage of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 191: 4025–9.

Fierer, J., and Guiney, D.G. (2001) Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J Clin Invest* 107: 775–80.

- 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.
- Galán, J.E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T.C., and Wagner, S.** (2014) Bacterial Type III Secretion Systems: Specialized Nanomachines for Protein Delivery into Target Cells. *Annu Rev Microbiol* 68: 415–438.
- Geddes, K., Worley, M., Niemann, G., and Heffron, F.** (2005) Identification of new secreted effectors in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 73: 6260–71.
- Gerlach, R.G., Jäckel, D., Stecher, B., Wagner, C., Lupas, A., Hardt, W.-D., and Hensel, M.** (2007) *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol* 9: 1834–1850.
- Giammanco, G.M., Pignato, S., Mammìna, C., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Nastasi, A., and Giammanco, G.** (2002) Persistent endemicity of *Salmonella bongori* 48:z(35):--in Southern Italy: molecular characterization of human, animal, and environmental isolates. *J Clin Microbiol* 40: 3502–5.
- 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: e02170-15.
- Golubeva, Y.A., Sadik, A.Y., Ellermeier, J.R., and Slauch, J.M.** (2012) Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *Genetics* 190: 79–90.
- Goodier, R.I., and Ahmer, B.M.** (2001) SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol* 183: 2249–58.
- Goto, R., Miki, T., Nakamura, N., Fujimoto, M., and Okada, N.** (2017) *Salmonella* Typhimurium PagP- and UgtL-dependent resistance to antimicrobial peptides contributes to the gut colonization. *PLoS One* 12: e0190095.
- 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* 200: e00750-17.
- Groisman, E.A.** (1998) The ins and outs of virulence gene expression: Mg²⁺ as a regulatory signal. *BioEssays* 20: 96–101.
- Groisman, E.A.** (2001) The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* 183: 1835–42.
- Groisman, E.A., and Ochman, H.** (1996) Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 87: 791–4.
- Hansen-Wester, I., and Hensel, M.** (2001) *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* 3: 549–559.
- Hapfelmeier, S., Stecher, B., Barthel, M., Kremer, M., Müller, A.J., Heikenwalder, M., et al.** (2005) The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* 174: 1675–85.
- Haraga, A., Ohlson, M.B., and 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.
- Hensel, M., Nikolaus, T., and Egelseer, C.** (1999) Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* 31: 489–98.
- Hoise, S.K., and Stocker, B.A.D.** (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291: 238–239.
- Hume, P.J., Singh, V., Davidson, A.C., and Koronakis, V.** (2017) Swiss Army Pathogen: The *Salmonella* Entry Toolkit. *Front Cell Infect Microbiol* 7: 348.
- Hung, C.-C., Garner, C.D., Slauch, J.M., Dwyer, Z.W., Lawhon, S.D., Frye, J.G., et al.** (2013) The intestinal fatty acid propionate inhibits *Salmonella* invasion through the post-translational control of HilD. *Mol Microbiol* 87: 1045–1060.
- Husseiny, M.I., and Hensel, M.** (2005) Rapid method for the construction of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium vaccine carrier strains. *Infect Immun* 73: 1598–605.
- Ibarra, J.A., Knodler, L.A., Sturdevant, D.E., Virtaneva, K., Carmody, A.B., Fischer, E.R., et al.** (2010) Induction of *Salmonella* pathogenicity island 1 under different growth conditions can affect *Salmonella*-host cell interactions *in vitro*. *Microbiology* 156: 1120–33.
- 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.
- Jones, B.D.** (2005) *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *J Microbiol* 43: 110–7.
- Klein, J.R., Fahlen, T.F., and Jones, B.D.** (2000) Transcriptional Organization and Function of Invasion Genes within *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Pathogenicity Island 1, Including the *prgH, prgI, prgJ, prgK, orgA, orgB,* and *orgC* Genes. *Infect Immun* 68: 3368–3376.
- Knodler, L.A., Vallance, B.A., Celli, J., Winfree, S., Hansen, B., Montero, M., and Steele-Mortimer, O.** (2010) Dissemination of invasive *Salmonella* via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 17733–8.
- Kröger, C., Colgan, A., Srikumar, S., Händler, K., Sivasankaran, S.K., Hammarlöf, D.L., et al.** (2013) An Infection-Relevant Transcriptomic Compendium for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Cell Host Microbe* 14: 683–695.
- la Cruz, M.Á. De, Fernández-Mora, M., Guadarrama, C., Flores-Valdez, M.A., Bustamante, V.H., Vázquez, A., and Calva, E.** (2007) LeuO antagonizes H-NS and StpA-dependent repression in *Salmonella enterica ompS1*. *Mol Microbiol* 66: 727–743.
- Lambert, M.A., and Smith, S.G.** (2008) The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasin. *BMC Microbiol* 8: 142.
- Lambert, M.A., and Smith, S.G.J.** (2009) The PagN protein mediates invasion via interaction with proteoglycan. *FEMS Microbiol Lett* 297: 209–216.
- Laughlin, R.C., Knodler, L.A., Barhoumi, R., Payne, H.R., Wu, J., Gomez, G., et al.** (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., 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.

- Lee, A.K., Detweiler, C.S., and Falkow, S.** (2000) OmpR Regulates the Two-Component System SsrA-SsrB in *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *J Bacteriol* 182: 771–781.
- Linehan, S.A., Rytönen, A., Yu, X.-J., Liu, M., and Holden, D.W.** (2005) SlyA regulates function of *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) and expression of SPI-2-associated genes. *Infect Immun* 73: 4354–62.
- Löber, S., Jäckel, D., Kaiser, N., and Hensel, M.** (2006) Regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes by independent environmental signals. *Int J Med Microbiol* 296: 435–47.
- Lucchini, S., Rowley, G., Goldberg, M.D., Hurd, D., Harrison, M., and Hinton, J.C.D.** (2006) H-NS Mediates the Silencing of Laterally Acquired Genes in Bacteria. *PLoS Pathog* 2: e81.
- Lundberg, U., Vinatzer, U., Berdnik, D., Gabain, A. von, and Baccarini, M.** (1999) Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol* 181: 3433–7.
- Macnab, R.M.** (2003) How Bacteria Assemble Flagella. *Annu Rev Microbiol* 57: 77–100.
- Marcus, S.L., Brumell, J.H., Pfeifer, C.G., and Finlay, B.B.** (2000) *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* 2: 145–156.
- 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.
- Martínez, L.C., Banda, M.M., Fernández-Mora, M., Santana, F.J., and Bustamante, V.H.** (2014) HilD induces expression of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes by displacing the global negative regulator H-NS from *ssrAB*. *J Bacteriol* 196: 3746–55.
- 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.
- Matsui, M., Takaya, A., and Yamamoto, T.** (2008) σ^{32} -mediated negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 expression. *J Bacteriol* 190: 6636–45.
- Mayer, M.P.** (1995) A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* 163: 41–46.
- Miao, E.A., and Miller, S.I.** (2000) A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7539–44.
- Moest, T.P., and Méresse, S.** (2013) *Salmonella* T3SSs: successful mission of the secret(ion) agents. *Curr Opin Microbiol* 16: 38–44.
- Mousslim, C., and Hughes, K.T.** (2014) The Effect of Cell Growth Phase on the Regulatory Cross-Talk between Flagellar and Spi1 Virulence Gene Expression. *PLoS Pathog* 10: e1003987.
- Navarre, W.W.** (2006) Selective Silencing of Foreign DNA with Low GC Content by the H-NS Protein in *Salmonella*. *Science* 313: 236–238.
- Navarre, W.W., Halsey, T.A., Walthers, D., Frye, J., McClelland, M., Potter, J.L., et al.** (2005) Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Mol Microbiol* 56: 492–508.

- Navarre, W.W., Porwollik, S., Wang, Y., McClelland, M., Rosen, H., Libby, S.J., and Fang, F.C. (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* 313: 236–8.
- Norte, V.A., Stapleton, M.R., and Green, J. (2003) PhoP-responsive expression of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium *slyA* gene. *J Bacteriol* 185: 3508–14.
- Núñez-Hernández, C., Tierrez, A., Ortega, A.D., Pucciarelli, M.G., Godoy, M., Eisman, B., et al. (2013) Genome expression analysis of nonproliferating intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium unravels an acid pH-dependent PhoP-PhoQ response essential for dormancy. *Infect Immun* 81: 154–65.
- Olekhnovich, 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.
- Olekhnovich, I.N., and Kadner, R.J. (2006) Crucial roles of both flanking sequences in silencing of the *hilA* promoter in *Salmonella enterica*. *J Mol Biol* 357: 373–86.
- Olekhnovich, 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: 6882–90.
- Osborne, S.E., Walthers, D., Tomljenovic, A.M., Mulder, D.T., Silphaduang, U., Duong, N., et al. (2009) Pathogenic adaptation of intracellular bacteria by rewiring a cis-regulatory input function. *Proc Natl Acad Sci* 106: 3982–3987.
- Paredes-Amaya, C.C., Valdés-García, G., Juárez-González, V.R., Rudiño-Piñera, E., and Bustamante, V.H. (2018) The Hcp-like protein Hile inhibits homodimerization and DNA binding of the virulence-associated transcriptional regulator HilD in *Salmonella*. *J Biol Chem* 293: 6578–6592.
- Parsons, D.A., and Heffron, F. (2005) *sciS*, an *icmF* homolog in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, limits intracellular replication and decreases virulence. *Infect Immun* 73: 4338–45.
- Pegues, D.A., Hantman, M.J., Behlau, I., and Miller, S.I. (1995) PhoP/PhoQ transcriptional repression of *Salmonella typhimurium* invasion genes: evidence for a role in protein secretion. *Mol Microbiol* 17: 169–181.
- Pérez-Morales, D., Banda, M.M., Chau, N.Y.E., Salgado, H., Martínez-Flores, I., Ibarra, J.A., et al. (2017) The transcriptional regulator SsrB is involved in a molecular switch controlling virulence lifestyles of *Salmonella*. *PLoS Pathog* 13: e1006497.
- Perez, J.C., Latifi, T., and Groisman, E.A. (2008) Overcoming H-NS-mediated transcriptional silencing of horizontally acquired genes by the PhoP and SlyA proteins in *Salmonella enterica*. *J Biol Chem* 283: 10773–83.
- Pernestig, A.K., Melefors, O., and Georgellis, D. (2001) Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276: 225–31.
- Petrone, B.L., Stringer, A.M., and Wade, J.T. (2014) Identification of HilD-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 196: 1094–101.
- Portillo, F.G., Foster, J.W., and Finlay, B.B. (1993) Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun* 61: 4489–4492.
- Porwollik, S., and McClelland, M. (2003) Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infect* 5: 977–989.
- Prost, L.R., and Miller, S.I. (2008) The *Salmonellae* PhoQ sensor: mechanisms of detection of

phagosome signals. *Cell Microbiol* 10: 576–582.

Rico-Pérez, G., Pezza, A., Pucciarelli, M.G., Pedro, M.A. de, Soncini, F.C., and García-del Portillo, F. (2016) A novel peptidoglycan D,L-endopeptidase induced by *Salmonella* inside eukaryotic cells contributes to virulence. *Mol Microbiol* 99: 546–556.

Saini, S., and Rao, C. V (2010) SprB is the molecular link between *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4. *J Bacteriol* 192: 2459–62.

Santos, R.L., Tsolis, R.M., Bäumlér, A.J., and Adams, L.G. (2003) Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. *Brazilian J Med Biol Res* 36: 03-12.

Santos, R.L., Zhang, S., Tsolis, R.M., Kingsley, R.A., Garry Adams, L., and Bäumlér, A.J. (2001) Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect* 3: 1335–1344.

Schechter, L.M., Damrauer, S.M., and Lee, C.A. (1999) Two AraC/XylS family members can independently counteract the effect of repressing sequences upstream of the *hilA* promoter. *Mol Microbiol* 32: 629–42.

Schechter, L.M., Jain, S., Akbar, S., and Lee, C.A. (2003) The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU, and Fis affect *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 71: 5432–5.

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: 1289–99.

Schmidt, H., and Hensel, M. (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 17: 14–56.

Shi, Y., Latifi, T., Cromie, M.J., and Groisman, E.A. (2004) Transcriptional control of the antimicrobial peptide resistance *ugtL* gene by the *Salmonella* PhoP and SlyA regulatory proteins. *J Biol Chem* 279: 38618–25.

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: 1448–57.

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: e01024-16.

Soncini, F.C., García Véscovi, E., Solomon, F., and Groisman, E.A. (1996) Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes. *J Bacteriol* 178: 5092–9.

Song, H., Kong, W., Weatherspoon, N., Qin, G., Tyler, W., Turk, J., et al. (2008) Modulation of the Regulatory Activity of Bacterial Two-component Systems by SlyA. *J Biol Chem* 283: 28158–28168.

Srikumar, S., Kröger, C., Hébrard, M., Colgan, A., Owen, S. V., Sivasankaran, S.K., et al. (2015) RNA-seq Brings New Insights to the Intra-Macrophage Transcriptome of *Salmonella* Typhimurium. *PLOS Pathog* 11: e1005262.

Stecher, B., Hapfelmeier, S., Müller, C., Kremer, M., Stallmach, T., and Hardt, W.-D. (2004) Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect Immun* 72: 4138–50.

Takaya, A., Kubota, Y., Isogai, E., and Yamamoto, T. (2004) 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.

Thijs, I.M. V, Keersmaecker, S.C.J. De, Fadda, A., Engelen, K., Zhao, H., McClelland, M., et al. (2007) Delineation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulon through genome-wide location and transcript analysis. *J Bacteriol* 189: 4587–96.

Tierrez, A., and García-del Portillo, F. (2005) New concepts in *Salmonella* virulence: the importance of reducing the intracellular growth rate in the host. *Cell Microbiol* 7: 901–909.

Tsolis, R.M., Townsend, S.M., Miao, E.A., Miller, S.I., Ficht, T.A., Adams, L.G., and Bäumler, A.J. (1999) Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype typhimurium host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* 67: 6385–93.

Tsolis, R.M., Xavier, M.N., Santos, R.L., and Bäumler, A.J. (2011) How to become a top model: impact of animal experimentation on human *Salmonella* disease research. *Infect Immun* 79: 1806–14.

Ueguchi, C., Suzuki, T., Yoshida, T., Tanaka, K., and Mizuno, T. (1996) Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J Mol Biol* 263: 149–62.

Uzzau, S., Brown, D.J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., et al. (2000) Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect* 125: 229–55.

Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., and Bossi, L. (2001) Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15264–9.

Wagner, C., and Hensel, M. (2011) *Adhesive Mechanisms of Salmonella enterica*. Springer, Dordrecht, pp. 17–34.

Walthers, D., Carroll, R.K., Navarre, W.W., Libby, S.J., Fang, F.C., and Kenney, L.J. (2007) The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol* 65: 477–493.

Zhao, G., Weatherspoon, N., Kong, W., Curtiss, R., and Shi, Y. (2008) A dual-signal regulatory circuit activates transcription of a set of divergent operons in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci* 105: 20924–20929.

13. ANEXO

Artículos publicados del Proyecto de Doctorado

SCIENTIFIC REPORTS



Correction: Publisher Correction

OPEN

HilD and PhoP independently regulate the expression of *grhD1*, a novel gene required for *Salmonella* Typhimurium invasion of host cells

María M. Banda¹, Carolina López², Rubiceli Manzo¹, Gadea Rico-Pérez³, Pablo García³, Roberto Rosales-Reyes⁴, Miguel A. De la Cruz⁵, Fernando C. Soncini^{1,2}, Francisco García-del Portillo³ & Víctor H. Bustamante¹

When *Salmonella* is grown in the nutrient-rich lysogeny broth (LB), the AraC-like transcriptional regulator HilD positively controls the expression of genes required for *Salmonella* invasion of host cells, such as the *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) genes. However, in minimal media, the two-component system PhoP/Q activates the expression of genes necessary for *Salmonella* replication inside host cells, such as the SPI-2 genes. Recently, we found that the *SL1344_1872* hypothetical gene, located in a *S. Typhimurium* genomic island, is co-expressed with the SPI-1 genes. In this study we demonstrate that HilD induces indirectly the expression of *SL1344_1872* when *S. Typhimurium* is grown in LB; therefore, we named *SL1344_1872* as *grhD1* for gene regulated by HilD. Furthermore, we found that PhoP positively controls the expression of *grhD1*, independently of HilD, when *S. Typhimurium* is grown in LB or N-minimal medium. Moreover, we demonstrate that the *grhD1* gene is required for the invasion of *S. Typhimurium* into epithelial cells, macrophages and fibroblasts, as well as for the intestinal inflammatory response caused by *S. Typhimurium* in mice. Thus, our results reveal a novel virulence factor of *Salmonella*, whose expression is positively and independently controlled by the HilD and PhoP transcriptional regulators.

The acquisition of DNA fragments by horizontal transfer events has played a major role in the evolution of pathogenic bacteria. The acquired DNA may encode different factors that confer the ability to survive and replicate in distinct biological niches within an animal or human host, which leads to bacterial infection and disease^{1,2}. To take advantage of the information contained in the acquired DNA, bacteria adapt regulatory mechanisms that allow the expression of the gained genes in those conditions where it is beneficial³.

Salmonella enterica is an important pathogen of humans and animals, causing a mild self-limiting gastroenteritis or a severe systemic infection⁴. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (*S. Typhimurium*) is a major cause of gastroenteritis in humans and several animals; but can also produce a systemic infection in laboratory mice, similar to the typhoid fever produced by *S. Typhi* in humans^{4,5}. Therefore, *S. Typhimurium* is widely used as a model in infections to mice, cattle or eukaryotic cell cultures, to investigate the molecular mechanisms governing *Salmonella* virulence. Most of the virulence genes of *Salmonella* are grouped in acquired genomic regions called *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs)^{6–8}. SPI-1 and SPI-2 are major determinants for the *Salmonella* intestinal and systemic infection, respectively⁸. SPI-1 is present in the two *Salmonella* species, *S. enterica* and *S. bongori*, whereas SPI-2 is only conserved in the *S. enterica* species, suggesting that SPI-1 was acquired before SPI-2 during *Salmonella* evolution^{7,9}. SPI-1 and SPI-2 both encode type III secretion systems (T3SSs), their

¹Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, 62210, Mexico. ²Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina. ³Laboratorio de Patógenos Bacterianos Intracelulares, Centro Nacional de Biotecnología-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC), Madrid, Spain. ⁴Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico. ⁵Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, Mexico. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.H.B. (email: victor@ibt.unam.mx)

cognate effector proteins, chaperones and transcriptional regulators controlling the expression of the respective genes within each island^{8,10}. During initial infection, *Salmonella* invades host intestinal epithelium using the SPI-1-encoded T3SS (T3SS-1) and cognate effector proteins, which leads to gastroenteritis; by contrast, the SPI-2-encoded T3SS (T3SS-2) and cognate effector proteins provide to *Salmonella* the ability to survive and replicate inside epithelial cells and macrophages; within a membrane-bound compartment called *Salmonella*-containing vacuole (SCV), which leads to the systemic disease^{4,8}. The SPI-2 genes also mediate a *Salmonella* non-proliferative stage inside phagocytes and non-phagocytic cells^{11,12} and contribute to the development of the intestinal inflammatory response^{13–15}.

The SPI-1 and SPI-2 genes are expressed in different *in vivo* niches; the SPI-1 genes are activated when *Salmonella* is in the intestinal lumen and also in the cytosol of epithelial cells^{16,17}; whereas the SPI-2 genes are activated within the SCV of host cells, such as macrophages, epithelial cells and fibroblasts^{12,16,18–20}. The SPI-2 genes are also expressed in the intestinal lumen²¹, in the lamina propria or in the underlying mucosa¹⁷. *In vitro*, the SPI-1 genes are induced when *Salmonella* is grown at early stationary phase in the nutrient-rich lysogeny broth (LB)^{22–24}; in contrast, the SPI-2 genes are induced when *Salmonella* is grown at late stationary phase in nutrient-rich media, as well as in minimal media containing low concentrations of phosphate, calcium and magnesium^{19,23–25}.

The expression of the SPI-1 genes is controlled by the HilD, InvF and HilA regulators encoded in SPI-1, in a cascade fashion. HilD, an AraC-like transcriptional regulator, induces the expression of HilA, a regulator with an OmpR-ToxR-like DNA binding domain, which in turn activates the expression of InvF, another AraC-like regulator^{26–31}. HilA and InvF activate the expression of the SPI-1 genes encoding the T3SS-1 components and effector proteins, respectively⁸. HilD also induces the expression of HilA through a feed-forward regulatory loop that it forms with HilC and RtsA^{30,32}, which are AraC-like regulators that bind the DNA sites recognized by HilD^{33,34}; HilC and RtsA are encoded within and outside SPI-1, respectively⁸. Furthermore, HilD induces, directly or through HilA, InvF or several other regulators, the expression of many horizontally acquired virulence genes located in different islands, as well as ancestral genes including those for flagella biosynthesis and chemotaxis^{8,23,35–43}. Interestingly, HilD is involved in the expression of the *ssrAB* operon encoding the SsrA/B two-component system, the central positive regulator for the SPI-2 genes, but only when *Salmonella* is grown in LB^{23,44}. When *Salmonella* is grown in minimal media, the expression of the *ssrAB* operon, and thus the SPI-2 genes, is induced by other regulators such as the MarR-like regulator SlyA and the two-component systems OmpR/EnvZ and PhoP/PhoQ, independently of HilD^{8,45}.

The PhoP/PhoQ two-component system is formed by the sensor kinase protein PhoQ and its cognate response regulator PhoP^{46–48}. In response to environmental signals such as acidic pH, low concentration of magnesium and antimicrobial peptides, PhoQ autophosphorylates and then phosphorylates PhoP, which binds to target genes^{48–53}. Orthologous of PhoP/PhoQ are present in several bacteria, controlling the expression of genes for different cellular functions, including virulence, Mg²⁺ homeostasis, modification of lipopolysaccharides and resistance to antimicrobial peptides and acidic pH^{19,48,54–59}. PhoP directly or indirectly regulates the expression of ~9% of the *S. Typhimurium* genome, including the SPI-2 genes, thus having a fundamental role in physiology and virulence^{19,41,60–62}.

In this study, we show that the transcriptional regulator HilD indirectly induces the expression of the *SL1344_1872* hypothetical gene, when *S. Typhimurium* is grown in LB. Furthermore, we demonstrate that *SL1344_1872*, here named as *grhD1*, 'gene regulated by HilD', is required for the invasion of *S. Typhimurium* into host cells and for the intestinal inflammatory response caused by *S. Typhimurium* in mice. In addition, we found that the response regulator PhoP also positively regulates the expression of *grhD1*, directly and independently of HilD, in response to different growth conditions. Therefore, our results from this study reveal a novel *Salmonella* virulence factor, GrhD1, whose expression is controlled by two major transcriptional regulators of *Salmonella* pathogenicity, HilD and PhoP.

Results

HilD positively regulates the expression of the *SL1344_1872* (*grhD1*) gene. In a previous study, we identified a set of novel genes that are co-expressed with the SPI-1 genes in *S. Typhimurium*, by an *in silico* global expression analysis⁴². The characterization of some of these genes revealed a strong link between the co-expression with SPI-1 and the regulation by HilD. One uncharacterized gene co-expressed with SPI-1 is *SL1344_1872*, which is located in a *S. Typhimurium* acquired genomic island flanked by the *yecA* gene of unknown function and the tRNA-encoding *leuZ* gene (Fig. 1A). This island contains two additional genes, *SL1344_1873* (*ecgA*) and *SL1344_1874*, as well as the pseudogene *SL1344_1874A*; *SL1344_1873* and *SL1344_1874* encode a peptidoglycan enzyme (EcgA) with L-endopeptidase activity, involved in *S. Typhimurium* virulence, and a hypothetical membrane protein, respectively (Fig. 1A)⁶³. The *SL1344_1872* gene encodes a hypothetical protein of 101 amino acids, predicted to form four α -helices and four β -strands (Fig. 1B). *SL1344_1872* has no orthologs in other bacteria and does not present any conserved domain. Recent transcriptomic analysis supports that HilD positively regulates the expression of *SL1344_1872*⁴¹.

To determine whether *SL1344_1872* indeed codes for a protein and to confirm whether its expression is controlled by HilD, the *SL1344_1872* chromosomal gene was tagged in the wild-type (WT) *S. Typhimurium* SL1344 strain and its isogenic Δ *hilD* mutant, with the sequence encoding a 3XFLAG epitope. Total protein extracts were obtained from culture samples of these strains grown in LB at 37°C, conditions that induce the expression of the SPI-1 genes, which were analyzed by Western blotting using anti-FLAG antibodies. An expression signal was detected in the WT strain, with the expected size for the *SL1344_1872*-FLAG protein (Fig. 2A). The expression of *SL1344_1872*-FLAG was drastically reduced in the Δ *hilD* mutant; the pK6-HilD plasmid expressing HilD restored the expression of *SL1344_1872*-FLAG in the Δ *hilD* mutant to WT levels (Fig. 2A). To investigate whether HilD regulates *SL1344_1872* at transcriptional level, a transcriptional fusion of the intergenic region

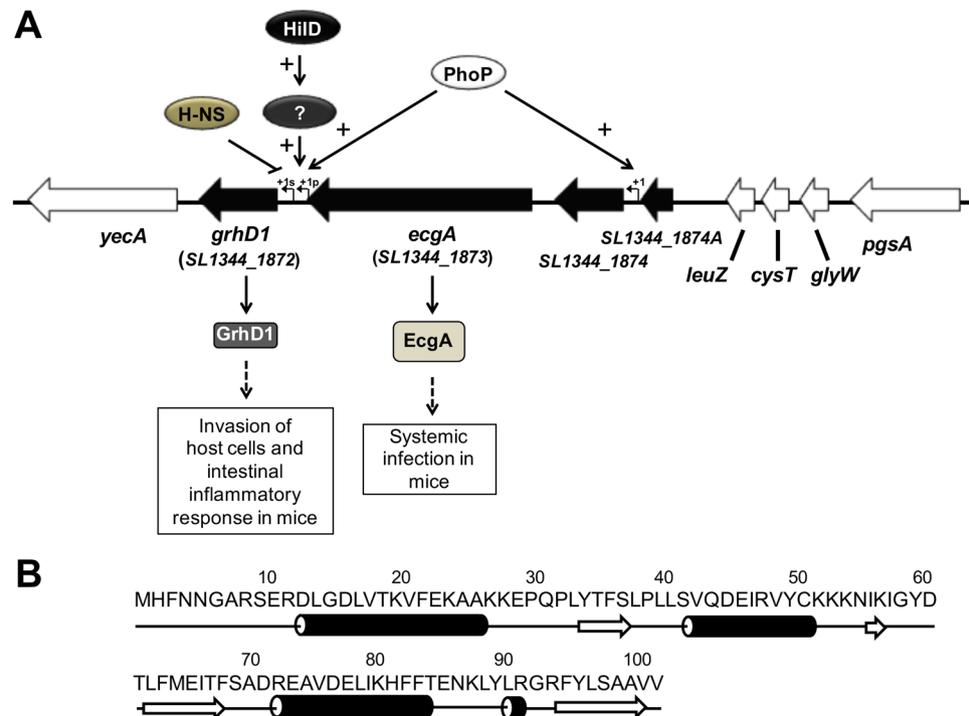


Figure 1. Genetic context, regulatory model and role in virulence of the *grhD1* (SL1344_1872) gene of *S. Typhimurium*, as well as sequence and predictive secondary structure of its product. (A) Schematic representation of the *S. Typhimurium* SL1344 genome region harbouring *grhD1*. Arrows indicate coding sequences and lines represent intergenic regions. Black arrows indicate all the genes that are located in the genomic island containing *grhD1*. Bent arrows represent the primary (+1p) and secondary (+1s) transcription start sites reported in a previous study²⁴. The virulence role for GrhD1 and EcgA, as well as the regulation by HilD, PhoP and H-NS, are also indicated. (B) Amino acid sequence and prediction of the secondary structure prediction of GrhD1. Arrows and cylinders indicate predicted β -strands and α -helices, respectively.

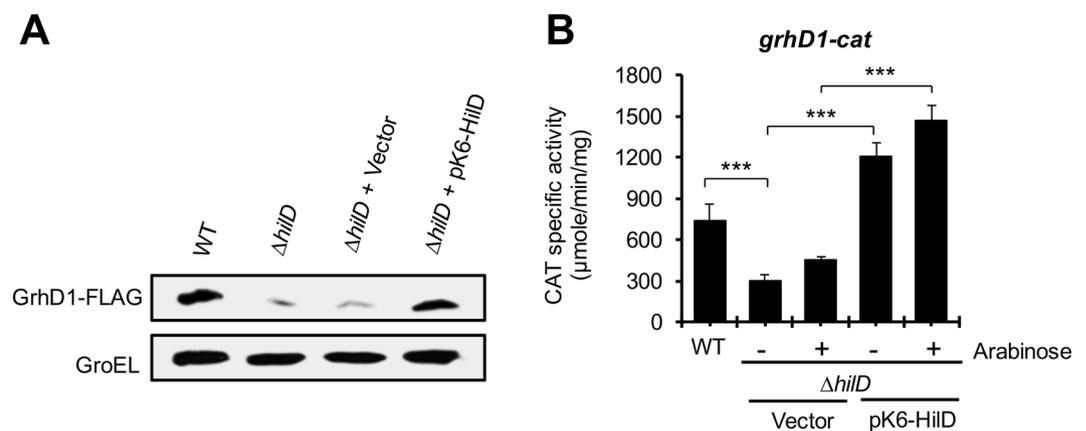


Figure 2. HilD positively regulates the expression of *grhD1* (SL1344_1872). (A) Expression of GrhD1-FLAG in the WT *S. Typhimurium* SL1344 strain and its derivative $\Delta hilD$ mutant containing or not the pK6-HilD plasmid, which expresses HilD from an arabinose-inducible promoter, or containing the pMPM-K6 Ω vector. The expression of GrhD1-FLAG was analyzed from samples of bacterial cultures grown in LB at 37°C by Western blotting, using monoclonal anti-FLAG antibodies. The expression of GroEL was also determined using polyclonal anti-GroEL antibodies, as a loading control. (B) Expression of the *grhD1-cat* transcriptional fusion contained in the pgrhD1-cat plasmid was determined in the WT *S. Typhimurium* strain and its derivative $\Delta hilD$ mutant carrying or not pK6-HilD or pMPM-K6 Ω . Expression of HilD from pK6-HilD was activated by adding 0.001% L-arabinose to the medium. CAT specific activity was determined from samples of bacterial cultures grown in LB at 37°C. Data are the average of three independent experiments done in duplicate. Bars represent the standard deviations. Statistically different values are indicated (***p < 0.001).

upstream of *SL1344_1872* to the *cat* reporter gene was constructed in the pKK232-8 plasmid. The chloramphenicol acetyl transferase (CAT)-specific activity from this fusion was determined in the WT *S. Typhimurium* strain and its isogenic Δ *hilD* mutant, grown in LB. The activity of the *SL1344_1872-cat* fusion showed a 2-fold decrease in the Δ *hilD* mutant with respect to the WT strain, and was induced 3-fold in the Δ *hilD* mutant by the expression of HilD from the pK6-HilD plasmid (Fig. 2B). Together, these results demonstrate that HilD positively regulates the expression of *SL1344_1872*, herein named *grhD1* for gene regulated by HilD.

We next investigated whether the control of *grhD1* expression by HilD is direct or indirect. Hence, electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were performed using affinity-purified maltose-binding protein (MBP)-HilD and the DNA fragment carrying the intergenic region upstream of *grhD1*. DNA fragments containing the regulatory regions of *hilA* or *sigD* were also tested as positive and negative controls, respectively. As expected, MBP-HilD specifically bound the DNA fragment of *hilA*, at concentrations of 0.5 to 1 μ M; in contrast, at the same concentrations it did not shift the DNA fragment of *grhD1*, or that of the negative control, *sigD* (Fig. S1A and B). These results support that HilD regulates *grhD1* indirectly; alternatively, an additional factor could be required for HilD binding on *grhD1*.

Escherichia coli K-12 lacks *hilD*, *hilA* and *grhD1*, as well as around 1400 other genes present in *S. Typhimurium*. The expression of genes known to be directly controlled by HilD, such as *hilA*, can be induced in *E. coli* K-12 when HilD is present⁴². Therefore, to further test if HilD regulates *grhD1* indirectly, the activity of the *grhD1-cat* fusion was determined in the *E. coli* MC4100 strain carrying the pK6-HilD plasmid, grown in LB. As a positive control, a *hilA-cat* transcriptional fusion was also examined. As expected, the activity of both *grhD1-cat* and *hilA-cat* fusions was decreased in *E. coli* MC4100 with respect to the WT *S. Typhimurium* strain (Fig. S1C and D). Expression of HilD from the pK6-HilD plasmid activated the *hilA-cat* fusion, but not the *grhD1-cat* fusion, in *E. coli* MC4100 (Fig. S1C and D), indicating that an additional *Salmonella* factor is required for the HilD-mediated expression of *grhD1*.

HilD induces the expression of several transcriptional regulators, including HilC, HilA and InvF, encoded in SPI-1, as well as RtsA, SsrB and FlhDC, encoded outside SPI-1^{8,23,31,38,40}. To investigate whether HilD regulates *grhD1* through any of these regulators, the expression of the *grhD1-cat* fusion was determined in the WT *S. Typhimurium* strain and its derivative Δ SPI-1 Δ *rtsA* mutant, as well as in Δ *ssrB*, Δ *flhDC*, Δ *hilA*, and Δ *invF* mutants, grown in LB. As expected, the *grhD1-cat* fusion presented a 2-fold-reduced expression in the Δ SPI-1 Δ *rtsA* mutant, since it lacks HilD; nevertheless, its expression was restored to WT levels in the presence of the pK6-HilD plasmid (Fig. S2A). On the other hand, the *grhD1-cat* fusion showed similar expression levels in the WT strain and its isogenic Δ *ssrB*, Δ *flhDC*, Δ *hilA*, and Δ *invF* mutants (Fig. S2B). These results indicate that the expression of *grhD1* induced by HilD does not require any other regulator encoded in SPI-1 (HilC, HilA, InvF, SprB), neither RtsA, SsrB or FlhDC, in the growth condition tested.

Collectively, these results show that HilD indirectly induces the expression of *grhD1*, through a yet-unknown regulator controlled by HilD, found in *S. Typhimurium* but not in *E. coli* MC4100.

PhoP positively regulates the expression of *grhD1*. Recently, we reported that the response regulator PhoP positively and directly controls the expression of the operon containing the *ecgA* and *SL1344_1874* genes, which is located close to *grhD1*, in the same *S. Typhimurium* genomic island (Fig. 1A)⁶³. Therefore, we thought that PhoP could also be involved in the expression of *grhD1*, which is supported by recent transcriptomic analyses⁴¹. In order to determine this, we examined the activity of the *grhD1-cat* transcriptional fusion in the WT *S. Typhimurium* strain and its derivative Δ *phoP* mutant, grown in LB or N-minimal medium (N-MM). PhoP is known to be active when *S. Typhimurium* is grown in the nutrient-rich LB or in minimal media containing low concentrations of magnesium⁶³. As positive and negative controls, the activity of transcriptional fusions to *cat* reporter of *pagK*, a gene positively regulated by PhoP, and *sirA*, a gene not regulated by PhoP, was also tested. The activity of the *grhD1-cat*, *pagK-cat* and *sirA-cat* fusions was higher in N-MM than in LB; however, the expression pattern for each fusion in the different genetic backgrounds tested was similar in both growth conditions (Fig. 3). The activity of the *grhD1-cat* and *pagK-cat* fusions was reduced in the Δ *phoP* mutant, with respect to the WT strain; expression of PhoP from pK3-PhoP recovered the activity of both fusions in the Δ *phoP* mutant to WT levels (Fig. 3A,B,D and E). In contrast, the activity of the *sirA-cat* fusion was not affected by the absence or overexpression of PhoP (Fig. 3C and F). To further support these results, we monitored the expression of GrhD1-FLAG in the WT strain and the Δ *phoP* mutant, grown in LB, intracellular salt medium (ISM) or acidified PCN (phosphate-carbon-nitrogen) medium. In all the conditions tested, the expression of GrhD1-FLAG was severely reduced in the Δ *phoP* mutant with respect to the WT strain (Fig. S3A and B). As expected, the presence of the pK3-PhoP plasmid restored the expression of GrhD1-FLAG in the Δ *phoP* mutant to WT levels (Fig. S3B). These results indicate that PhoP positively regulates the expression of *grhD1* in *S. Typhimurium* growing in LB or minimal media.

To determine whether PhoP regulates *grhD1* directly or indirectly, we performed EMSAs with phosphorylated affinity-purified PhoP-6XHis (PhoP-H6) fusion protein and a labelled DNA fragment containing the regulatory region of *grhD1*. DNA fragments carrying the regulatory region of the *orgB*⁵⁶ or *ges*⁶⁴ genes were also tested as positive and negative controls, respectively. PhoP-H6 shifted the *grhD1* and *orgB* fragments starting at a concentration of 3 μ M; in contrast, the *ges* fragment was not shifted even at a concentration of 6 μ M (Figs 4A and S4). Specific binding of PhoP-H6 to *grhD1* was confirmed by competitive EMSAs (Fig. 4B). Together with the results from expression analyses, these binding assays indicate that PhoP directly regulates the expression of the *grhD1* gene.

HilD and PhoP independently control the expression of *grhD1*. Our results indicate that both HilD and PhoP positively control the expression of *grhD1*, which could act independently of each other or one through the other; for instance, since HilD regulates *grhD1* indirectly, it could act through PhoP. To investigate this, firstly,

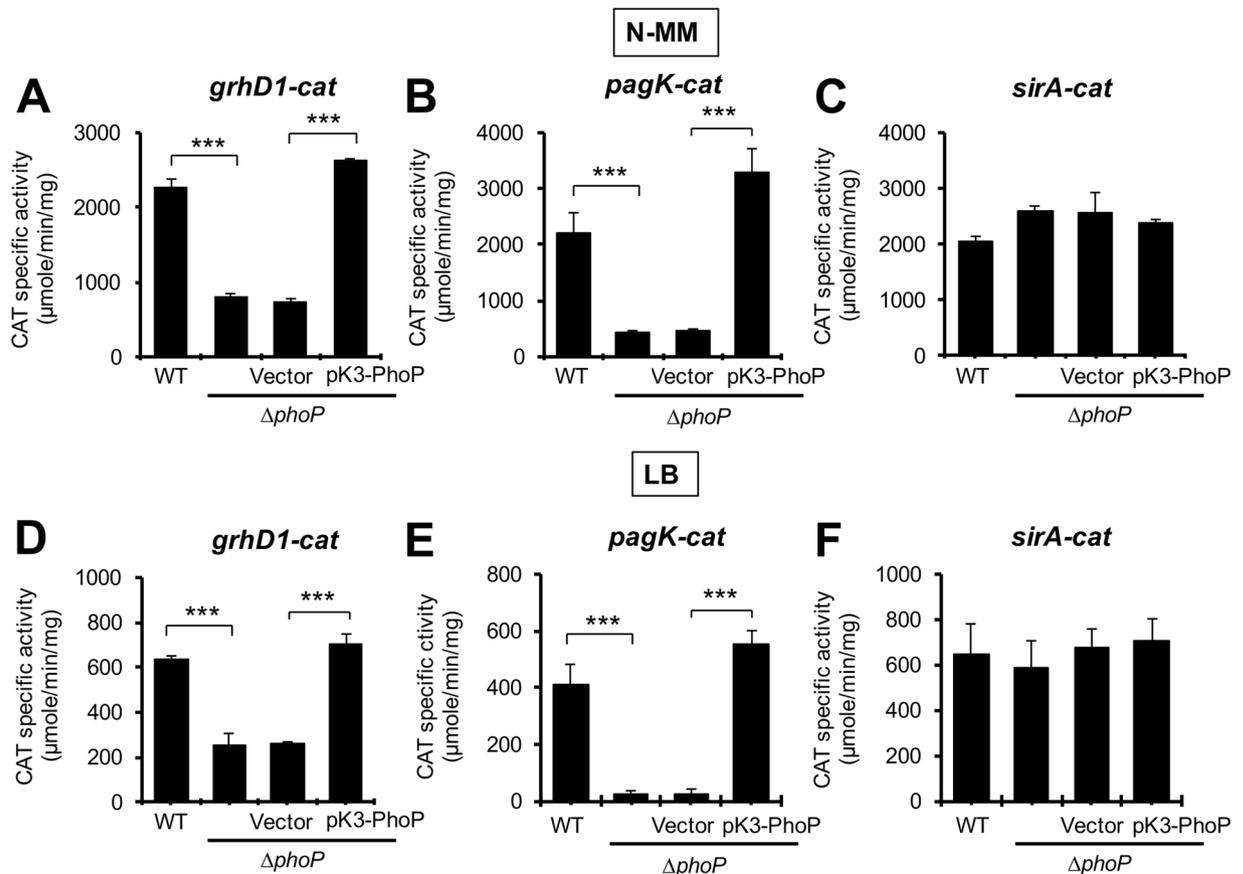


Figure 3. PhoP activates the expression of *grhD1*. Expression of the *grhD1-cat* (A,D), *pagK-cat* (B,E) and *sirA-cat* (C,F) transcriptional fusions contained in the pgrhD1-cat, ppagK-cat and psirA-cat plasmids, respectively, was determined in the WT *S. Typhimurium* strain and its derivative $\Delta phoP$ mutant containing or not the pK3-PhoP plasmid or the pMPM-K3 vector, grown in N-MM (A–C) or LB (D–F) at 37 °C. pK3-PhoP constitutively expresses PhoP from a *lac* derivative promoter. Data are the average of three independent experiments done in duplicate. Bars represent the standard deviations. Statistically different values are indicated (*** $p < 0.001$).

the expression of the *grhD1-cat* fusion was compared in the WT *S. Typhimurium* strain and its isogenic $\Delta hilD$, $\Delta phoP$ and $\Delta phoP \Delta hilD$ mutants, grown in LB or N-MM. In LB, the *grhD1-cat* fusion showed a similar 2-fold reduction of its activity in the $\Delta hilD$ and $\Delta phoP$ mutants with respect to the WT strain, whereas in the $\Delta phoP \Delta hilD$ double mutant its activity was even 4-fold lower than in the single mutants (Fig. 5A), indicating that HilD and PhoP have an additive effect on *grhD1*. In contrast, in N-MM, the activity of the *grhD1-cat* fusion was not affected in the $\Delta hilD$ mutant and presented a similar 2.5-fold decrease in the $\Delta phoP$ and $\Delta phoP \Delta hilD$ mutants (Fig. 5B), showing that PhoP regulate *grhD1* independently of HilD in these growth conditions. Then, we determined the activity of the *grhD1-cat* fusion in the $\Delta phoP \Delta hilD$ double mutant expressing PhoP, HilD and SirA from the pK3-PhoP, pK6-HilD or pK3-SirA plasmids, respectively, grown in LB. SirA is a transcriptional regulator expected to be not involved in the expression of *grhD1*. Expression of PhoP or HilD, but not SirA, induced the activity of the *grhD1-cat* fusion in the $\Delta phoP \Delta hilD$ mutant (Fig. 5C). Together, these results show that PhoP and HilD regulate *grhD1* independently of each other; interestingly, the overexpression of one of these regulators compensates the absence of the other for *grhD1* expression.

Previous RNA-sequencing analyses revealed a primary and a secondary transcriptional start site (TSS) in the intergenic region upstream of *grhD1*, located at 230 and 148bp from the start codon of *grhD1*, respectively (Fig. 6A)²⁴. The *grhD1-cat* fusion tested in the experiments described above carries a DNA region containing these two TSSs. Therefore, to define whether the expression of *grhD1* is sustained by two promoters and in that case, whether HilD and PhoP each affects one or both promoters, we constructed three additional *grhD1-cat* transcriptional fusions. The *grhD1L-cat* fusion carries an extended 3' *grhD1* upstream region with respect to that contained in the initial assessed *grhD1-cat* fusion, whereas the *grhD1 + 1p-cat* and *grhD1 + 1s-cat* fusions carry segments of the *grhD1* upstream region containing only the primary or secondary TSS, respectively (Fig. 6A). The activity of these new constructed fusions was monitored in the WT *S. Typhimurium* strain and its isogenic $\Delta phoP \Delta hilD$ double mutant, grown in LB. The *grhD1L-cat*, *grhD1 + 1p-cat* and *grhD1 + 1s-cat* fusions were similarly expressed in the WT strain (Fig. 6B–D), indicating that two independent promoters sustain the expression of *grhD1* in these growth conditions. The *grhD1L-cat* fusion, carrying both promoters, showed a 17-fold-reduced activity in the $\Delta phoP \Delta hilD$ mutant, which was restored to WT levels or even higher by the expression of PhoP or HilD from the pK3-PhoP or pK6-HilD plasmids, respectively (Fig. 6B). Thus, these results, together with those

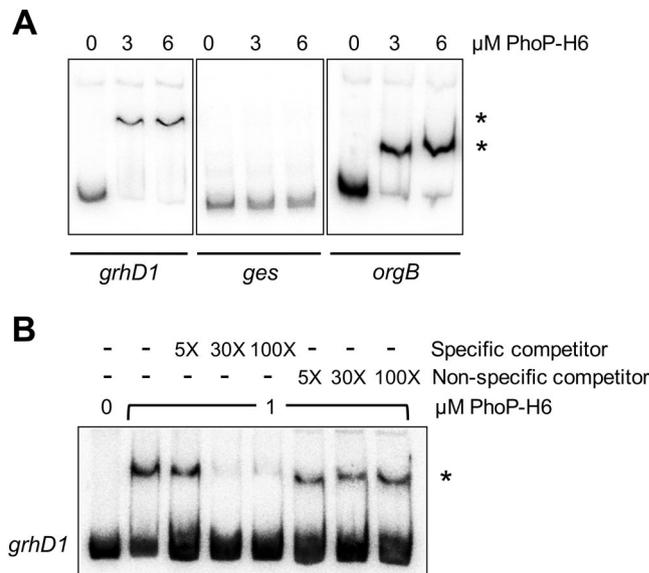


Figure 4. PhoP specifically binds to the *grhD1* regulatory region. EMSAs with PhoP-H6 and DNA fragments containing the regulatory regions of the *grhD1*, *ges* or *orgB* genes (A). ^{32}P -5'-end-labelled DNA fragments of the respective gene were incubated with increasing concentrations of purified and phosphorylated PhoP-H6 (0, 3 and 6 μM). The *ges* and *orgB* genes were used as negative and positive controls, respectively. PhoP binding to *grhD1* was further tested by competitive EMSAs (B). The ^{32}P -5'-end-labelled DNA fragment of *grhD1* was incubated with 1 μM of purified and phosphorylated PhoP-H6 in the absence or presence of 5-, 30- and 100-fold excess of unlabelled specific (*grhD1*) or non-specific (*nucA*) competitors. The DNA-protein complexes, which are indicated by an asterisk, were resolved in a nondenaturing 8% Tris-borate-EDTA-polyacrylamide gel. After electrophoresis, the gel was dried and analyzed in a Typhoon FLA 7000 IP laser scanner.

from Fig. 5C, support that HilD and PhoP independently induce the transcription of both *grhD1* promoters. Surprisingly, the activity of the *grhD1* + *1p-cat* and *grhD1* + *1s-cat* fusions was not significantly affected in the ΔphoP ΔhilD mutant containing or not the pK3-PhoP plasmid, with respect to the WT strain; only the presence of pK6-HilD further increased the activity of these fusions (Fig. 6C and D). These results suggest that proper control of *grhD1* expression requires negative regulatory sequences located around the promoters; in the absence of these sequences the expression of *grhD1* becomes independent of HilD and PhoP.

H-NS represses the expression of *grhD1*. The histone-like protein H-NS works as a global transcriptional regulator that silences the expression of genes acquired by *Salmonella*^{65,66}. We investigated whether the negative regulatory sequences on *grhD1* could mediate repression by H-NS. Given that the *hns* null mutation generates severe growth defects in *Salmonella*⁶⁶, we analyzed the effect of H-NS on *grhD1* by overexpressing the H-NS^{G113D} mutant, which does not have DNA-binding activity but still forms heterodimers with WT H-NS monomers⁶⁷ and thus acts as a dominant negative mutant⁶⁸. The activity of the *grhD1-cat* fusion was tested in the ΔhilD and ΔphoP mutants containing the pT6-HNS-G113D plasmid expressing H-NS^{G113D}, as well as in the WT strain. The expression of H-NS^{G113D} induced the activity of the *grhD1-cat* fusion in the ΔhilD mutant, but not in the ΔphoP mutant (Fig. S5A). These results indicate that with the inactivation of H-NS the expression of *grhD1* becomes independent of HilD, thus revealing that H-NS represses *grhD1*.

To determine whether H-NS regulates *grhD1* directly or indirectly, we performed EMSAs with the affinity-purified H-NS-3XFLAG-6XHis (H-NS-FH) protein and a fragment containing the *grhD1* regulatory region. DNA fragments containing the regulatory regions of *ssrAB* or *sigD* were also tested as positive and negative controls, respectively. H-NS-FH bound the DNA fragments of *grhD1* and *ssrAB*, starting at a concentration of 0.5 and 0.25 μM , respectively; as expected, it did not bind the negative control *sigD* (Fig. S5B and C). Together with the expression analyses, these binding assays demonstrate that H-NS directly represses the expression of *grhD1*.

GrhD1 is required for invasion of *S. Typhimurium* into host cells. HilD controls the expression of a high number of genes mainly required for *Salmonella* invasion of host cells^{8,40-43}. Therefore, we investigated whether the *grhD1* gene, also regulated by HilD, is involved in this virulence phenotype. Gentamicin protection assays were used to analyze the bacterial invasion of the WT *S. Typhimurium* strain and its derivative ΔgrhD1 mutant into HeLa cells and RAW264.7 mouse macrophages. The ΔhilD and ΔssrB mutants were also assessed as positive and negative controls, respectively. The ΔgrhD1 mutant showed a 4-fold reduction in the invasion of both HeLa cells and macrophages in comparison to the WT strain (Fig. 7A and B). As expected, the ΔssrB mutant was not affected in the invasion phenotype and the ΔhilD mutant was unable to invade the HeLa cells and macrophages (Fig. 7A and B). The invasion defect of the ΔgrhD1 mutant was also observed in NRK-49F fibroblasts using two different initial infection times (10 and 20 min) (Fig. S6). A centrifugation step can be used in

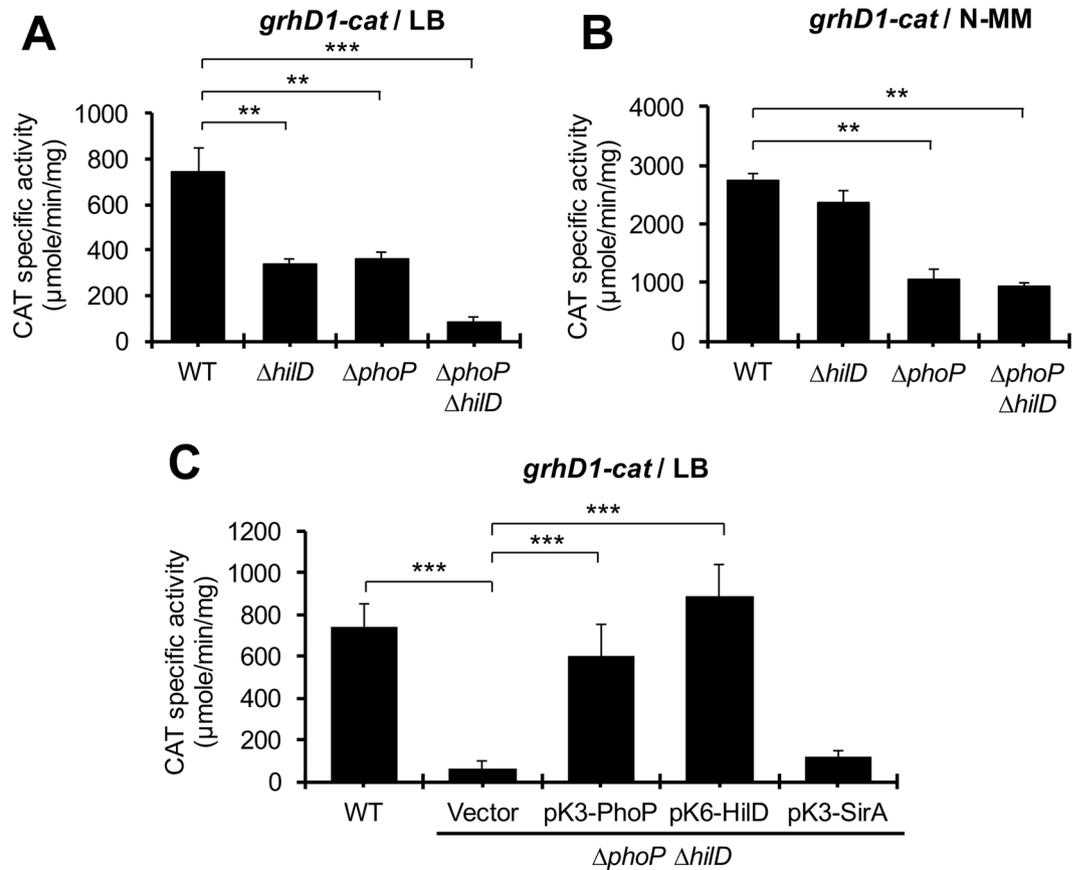


Figure 5. HilD and PhoP induce the expression of *grhD1* independently. Expression of the *grhD1-cat* transcriptional fusion contained in the p*grhD1-cat* plasmid was determined in the WT *S. Typhimurium* and its derivative $\Delta hilD$, $\Delta phoP$ and $\Delta phoP \Delta hilD$ mutants grown in LB (A) or N-MM (B) at 37°C, as well as in the WT *S. Typhimurium* strain and its isogenic $\Delta phoP \Delta hilD$ mutant carrying or not the pMPPM-K3 vector or the pK3-PhoP, pK6-HilD and pK3-SirA plasmids, grown in LB at 37°C (C). Expression of HilD from pK6-HilD was induced by adding 0.001% L-arabinose to the medium at the beginning of the bacterial cultures. pK3-PhoP and pK3-SirA constitutively express PhoP and SirA, respectively. Data are the average of three independent experiments done in duplicate. Bars represent the standard deviations. Statistically different values are indicated (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

the invasion assays to accelerate the contact between bacteria and eukaryotic cells, which overcomes an invasion deficiency by a motility defect⁶⁹. Even with the centrifugation step the $\Delta grhD1$ mutant showed a reduced invasion phenotype in HeLa cells, compared to the WT strain (Fig. S7A); in contrast, the $\Delta flhDC$ mutant, which lacks of motility, greatly recovered its ability to invade HeLa cells with the centrifugation step (Fig. S7B). Next, we sought to complement the invasion phenotype of the $\Delta grhD1$ mutant with a plasmid expressing GrhD1. For this, we constructed the low-copy number pK3-GrhD1 and pK3-GrhD1-FLAG plasmids, which constitutively express GrhD1 and GrhD1-FLAG proteins, respectively, from a constitutive *lac* promoter. Unexpectedly, the pK3-GrhD1 and pK3-GrhD1-FLAG plasmids further decreased the invasion of the $\Delta grhD1$ mutant to HeLa cells; moreover, these plasmids also drastically inhibited the invasion of the WT strain (Fig. S8A). To further explore this phenomenon, we monitored by Western blot the expression of the GrhD1-FLAG protein from the *grhD1::3XFLAG* gene located in the chromosome and that carried by the pK3-GrhD1-FLAG plasmid. As shown in Fig. S8B, GrhD1-FLAG reached much higher levels from the pK3-GrhD1-FLAG plasmid than from the chromosomal gene. Together, these results support that both the absence and overexpression of GrhD1 negatively affects the *S. Typhimurium* invasion of host cells independently of motility.

Since a specific concentration of GrhD1 seems to be required for its role in the *S. Typhimurium* invasion of host cells, we decided to complement the $\Delta grhD1$ mutant by inserting the *grhD1::3XFLAG* allele into the chromosome (Fig. S9). Expression of GrhD1-FLAG was similar in the complemented $\Delta grhD1 + grhD1-FLAG-kan$ strain and the WT strain carrying the *grhD1::3XFLAG* allele (Fig. S8C). Accordingly, the complemented $\Delta grhD1 + grhD1-FLAG-kan$ strain presented an invasion phenotype similar to that of the WT strain, in both HeLa cells and macrophages (Fig. 7C and D). These results confirm that GrhD1 is an additional *S. Typhimurium* factor required for invasion of host cells.

We also investigated whether *grhD1* have a role during survival/replication of *Salmonella* inside host cells. For this, we infected RAW264.7 macrophages and HeLa cells with the WT *S. Typhimurium* strain and its isogenic

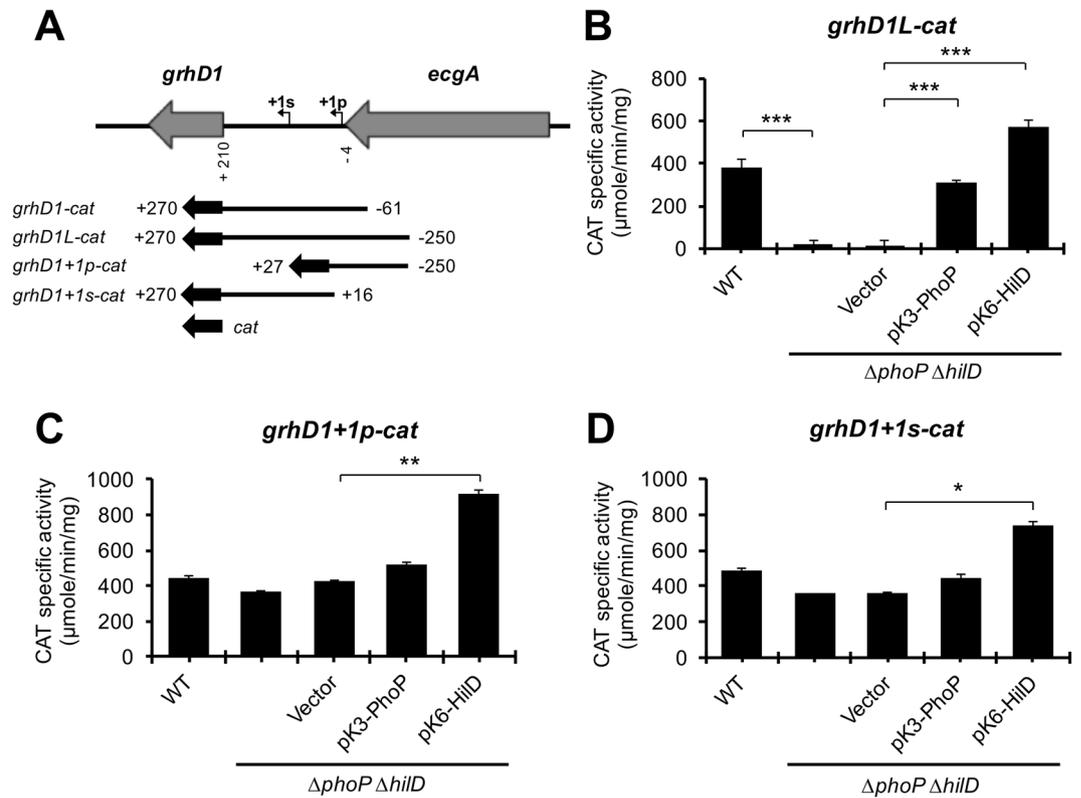


Figure 6. Two different promoters regulated by HilD and PhoP induce the expression of *grhD1*. Schematic representation of the intergenic region upstream *grhD1* (A). The primary (+1p) and secondary (+1s) transcription start sites of *grhD1*, previously reported²⁴, are indicated by a bent arrow. The DNA fragments carried by the *grhD1-cat*, *grhD1L-cat*, *grhD1+1p-cat* and *grhD1+1s-cat* transcriptional fusions, are shown; positions are indicated with respect to the primary transcriptional start site of *grhD1*. Expression of the *grhD1L-cat* (B), *grhD1+1p-cat* (C), and *grhD1+1s-cat* (D) transcriptional fusions contained in the p*grhD1L-cat*, p*grhD1+1p-cat* and p*grhD1+1s-cat* plasmids, respectively, was tested in the WT *S. Typhimurium* strain and its isogenic Δ *phoP* Δ *hilD* mutant carrying or not the pK3-PhoP or pK6-HilD plasmids, or the pMPPM-K3 vector. CAT specific activity was determined from samples of bacterial cultures grown in LB at 37 °C. Expression of HilD from pK6-HilD was induced by adding 0.001% L-arabinose to the medium at the beginning of the bacterial cultures. pK3-PhoP constitutively expresses PhoP. Data are the average of three independent experiments done in duplicate. Bars represent the standard deviations. Statistically different values are indicated (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001).

Δ *grhD1* mutant, as well as with the Δ *ssrB* mutant, used as a positive control. As expected, the Δ *ssrB* mutant presented an affected replication/survival ability, which was more evident in macrophages than in HeLa cells; in contrast, the replication/survival phenotype of the Δ *grhD1* mutant was very similar to that showed by the WT strain, in both macrophages and HeLa cells (Fig. S10A and B).

In all, these results indicate that *grhD1* is necessary for invasion of *S. Typhimurium* into host cells, but not for its intracellular replication/survival.

GrhD1 is required for the intestinal inflammatory response induced by *S. Typhimurium* in mice.

Salmonella invasion of intestinal epithelial cells eventually leads to the development of enterocolitis⁸. To determine whether GrhD1 is necessary for the induction of intestinal inflammation, we analyzed the infection caused by the WT *S. Typhimurium* strain and the Δ *grhD1* mutant in streptomycin-pretreated mice, which is used as a *S. Typhimurium* colitis model⁷⁰. As expected, the WT strain was able to colonize the intestine (cecum and ileum) and the spleen of mice (Fig. S11). Furthermore, the mice infected with the WT strain showed a reduced cecum weight and an increased infiltration of neutrophils in the cecum content (Fig. 8A and C), two hallmarks of the intestinal inflammatory response induced by *S. Typhimurium* in streptomycin-pretreated mice⁷⁰. Interestingly, the Δ *grhD1* mutant colonized the cecum similarly to the WT strain (Fig. S11); however, the mice infected with the Δ *grhD1* mutant showed a significant higher weight of the cecum and a significant lower infiltration of neutrophils in the cecum content, than those infected with the WT strain (Fig. 8A and C). Additionally, the Δ *grhD1* mutant showed a 3-fold reduction in the colonization of the ileum, with respect to the WT strain (Fig. S11). In contrast, the Δ *grhD1* mutant and the WT strain colonized similarly the spleen (Fig. S11) and the mice infected with these strains showed a similar weight of the spleen (Fig. 8B). These results show that GrhD1 is involved in the intestinal infection, particularly in the intestinal inflammatory response induced by *S. Typhimurium* in the streptomycin mouse model.

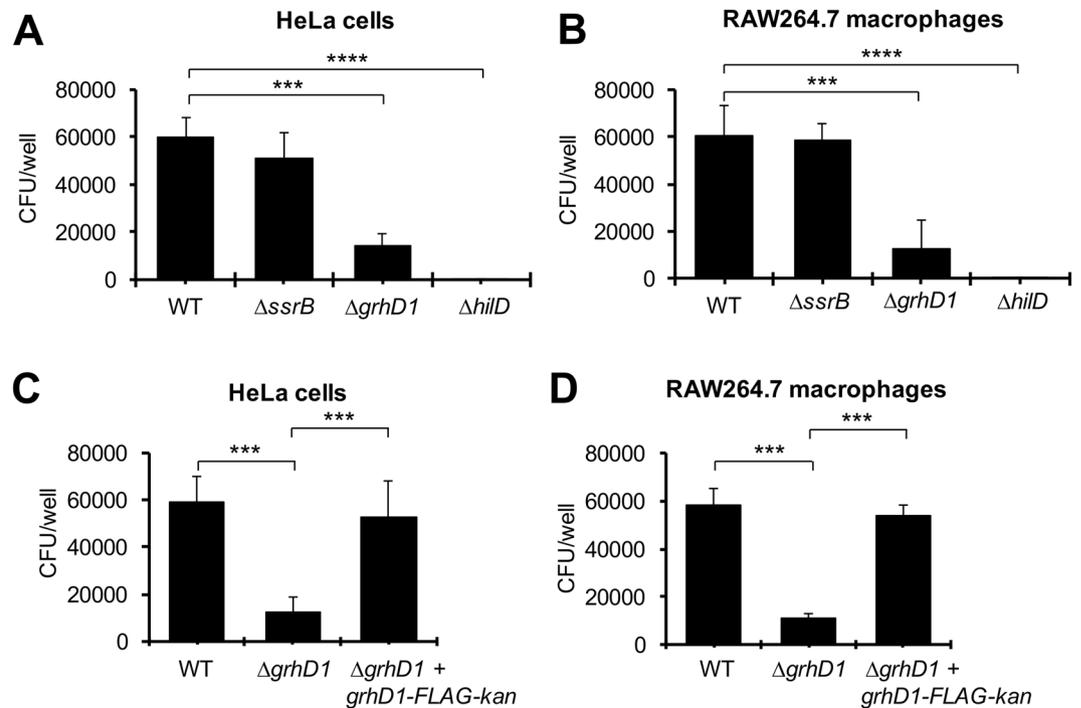


Figure 7. GrhD is required for invasion of *S. Typhimurium* into HeLa cells and macrophages. Epithelial HeLa cells (A) and murine RAW 264.7 macrophages (B) were infected with the WT *S. Typhimurium* strain or its isogenic $\Delta ssrB$, $\Delta grhD1$ and $\Delta hilD$ mutants. Epithelial HeLa cells (C) and murine RAW 264.7 macrophages (D) were infected with the WT *S. Typhimurium* strain and its isogenic $\Delta grhD1$ and $\Delta grhD1 + grhD1-FLAG-kan$ mutants. Invasion was measured by enumerating the intracellular CFUs at 1 h post-infection, using a gentamicin protection assay. Data are the average of three independent experiments done in triplicate. Bars represent the standard deviations. Statistically different values are indicated (** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

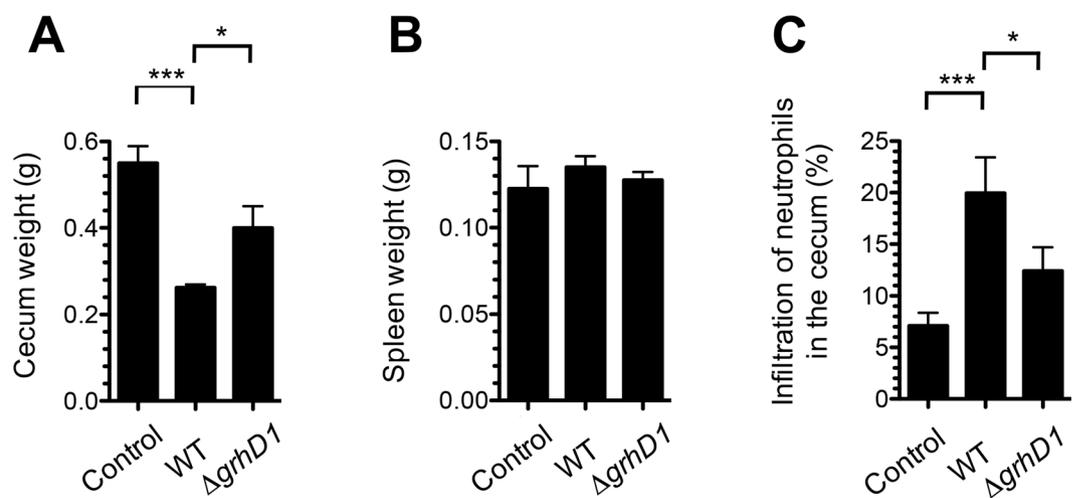


Figure 8. GrhD1 is involved in the intestinal inflammatory response induced by *S. Typhimurium* in mice. Mice pretreated with streptomycin were infected with the WT *S. Typhimurium* strain or the $\Delta grhD1$ mutant, or treated with sterile 1X PBS (Control). The mice were sacrificed two days post-infection and the total weight (g) of the cecum (A) and the spleen (B), as well as the infiltration of neutrophils in the cecum content (C), was measured for each mouse. Samples of the cecum content were analyzed by microscopy to determine the number of neutrophils with respect to the total eukaryotic cells, which is expressed as a percentage score. Data are the average from four separate animals. Bars represent the standard deviations. Statistically different values are indicated (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

Discussion

HilD and PhoP are two major transcriptional regulators controlling the expression of virulence genes in *Salmonella*⁸. Our results reveal one additional virulence gene, *grhD1*, which is regulated by HilD and PhoP. When *S. Typhimurium* proliferates in conditions that favor expression of the SPI-1 and other genes required for the *Salmonella* invasion of host cells, both HilD and PhoP are required for the expression of *grhD1*. We show that HilD and PhoP independently affect two promoters located upstream *grhD1*; PhoP directly and HilD through an additional factor that remains to be identified. Furthermore, our data also show that the histone-like protein H-NS directly represses the expression of *grhD1*; H-NS silences the expression of many other genes acquired by *Salmonella*^{65,66}. A model for the regulation of the *grhD1* expression is depicted in Fig. 1A.

HilD and PhoP also positively and independently regulate the expression of the *orgBC* SPI-1 operon, in SPI-1-inducing growth conditions, PhoP directly and HilD through HilA^{8,56}. This operon codes for a cytoplasmic protein required for invasion and an effector protein secreted through the T3SS-1, OrgB and OrgC, respectively^{71,72}. Opposite regulation mediated by HilD and PhoP on the *hila* gene, encoding a master regulator for the SPI-1 genes, has also been reported^{26,29,73,74}. Additionally, HilD and PhoP positively and independently regulate the expression of the *slrP* gene, in SPI-1-inducing growth conditions, PhoP directly and HilD by an unknown mechanism³⁷. The *slrP* gene encodes a virulence effector protein that is translocated into macrophages through both T3SS-1 and T3SS-2²⁵. The overlap between the HilD and PhoP regulons extends to several other genes, as revealed by recent transcriptomic analyses⁴¹ and by our results (unpublished).

We found that GrhD1 is required for the invasion of *S. Typhimurium* to host cells; interestingly, both the absence or overexpression of GrhD1 inhibit the invasion phenotype. Consistently, we show that GrhD1 is involved in the intestinal inflammatory response induced by *S. Typhimurium* in streptomycin-pretreated mice. Many other genes regulated by HilD, such as the SPI-1 genes, required for the invasion of host cells, also contribute to the induction of intestinal inflammatory response^{8,14,15,75}. Our results indicate that GrhD1 is not secreted when *S. Typhimurium* is grown in SPI-1-inducing growth conditions (Fig. S12); on the other hand, the absence of GrhD1 does not affect the typical SPI-1-mediated protein secretion profile or has a significant effect on motility (Fig. S13), which are all factors involved in the *Salmonella* invasion of host cells. Therefore, the specific role of GrhD1 for invasion remains to be defined, which is a matter of our current investigation.

During the growth of *S. Typhimurium* in minimal media, which favor expression of the SPI-2 and other genes required for the *Salmonella* replication inside host cells, the expression of *grhD1* requires PhoP, but not HilD. In SPI-2-inducing growth conditions, PhoP also positively controls transcription of the *orgBC* operon and the *slrP* gene independently of HilD^{37,56}. In addition to PhoP, SlyA and possibly other regulators are also involved in the expression of *grhD1* in SPI-2-inducing growth conditions, as revealed by transcriptomic analyses⁴¹ and confirmed by our results (Fig. S3A). PhoP and SlyA induce expression of virulence genes when *Salmonella* is within host cells⁸; consistently, the *grhD1* gene is expressed inside macrophages^{20,76}. Our results indicate that the *grhD1* gene is not necessary for the replication of *S. Typhimurium* inside HeLa cells and RAW264.7 mouse macrophages. Furthermore, our results show that *grhD1* is not required for the colonization of the spleen of streptomycin-pretreated mice, which suggests that it is not involved in the systemic infection caused by *S. Typhimurium*. PhoP positively regulates the *ecgA-SL1344_1874* operon, located close to the *grhD1* gene, in the same genomic island; this operon codes for EcgA, a peptidoglycan D,L-endopeptidase that contributes to systemic infection in mice, but it is not required for the invasion of or replication within HeLa cells of *S. Typhimurium*⁶³.

Our results indicate that PhoP and SlyA are required for the expression of the *grhD1* gene in both SPI-1-inducing and SPI-2-inducing growth conditions, which could be explained by the reciprocal positive regulation between PhoP and SlyA that has been demonstrated in *Salmonella*^{77–80}.

Our findings further expand the HilD, PhoP and SlyA regulons, provide additional evidence on the overlap between these virulence regulons, and reveal a novel virulence factor of *Salmonella*.

Methods

Bacterial strains and growth conditions. Bacterial strains used in this work are listed in Table S1. Bacterial cultures were grown at 37 °C in nutrient-rich lysogeny broth (LB), N-minimal medium (N-MM), phosphate-carbon-nitrogen (PCN) minimal medium or intracellular salts medium (ISM) as described previously^{81,82}. When needed, the antibiotics ampicillin (200 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml), kanamycin (20 µg/ml) or tetracycline (10 µg/ml) were added to the media. The chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assays were performed as we described previously^{23,83}.

Construction of plasmids. Tables S1 and S2 indicate the plasmids and primers used in this study, respectively. To construct the plasmids containing the transcriptional fusions pgrhD1-cat, pgrhD1L-cat, pgrhD1 + 1p-cat and pgrhD1 + 1s-cat, different segments of the upstream region of *grhD1* were amplified by PCR with the combination of primers 1872FW-1/1872RV-2, 1872FW-1/1872Rv-3, 1872FW-1/1872Rv + 1s, and 1872Fw + 1p/1872Rv-3, respectively. The generated PCR products were digested with SalI and HindIII restriction enzymes, purified and cloned into the vector pKK232-8, which carries a *cat* reporter gene lacking the promoter (Amersham Pharmacia LKB Biotechnology), digested with the same restriction enzymes. To construct the ppagK-cat plasmid, the upstream region of *pagK* was amplified by PCR with the primers pagKyM-Fw and pagKyM-Rv. This PCR product was digested with BamHI and HindIII restriction enzymes, purified and cloned into the vector pKK232-8 digested with the same restriction enzymes. To construct the pK3-PhoP plasmid, the *phoP* gene was amplified by PCR using the primers PhoP-RV11 and PhoPFW22. This PCR product was digested with BamHI and HindIII restriction enzymes, purified and ligated into the pMPM-K3 vector⁸⁴ digested with the same restriction enzymes. The pK3-PhoP plasmid expresses PhoP from the vector *lac* promoter. To construct the pBAD-H-NS-FH plasmid, the *hns* gene was amplified by PCR using the primers HNS-NcoI and Flag-His, and chromosomal DNA from the EPEC E2348/69 *hns::3xFLAG-kan* strain (V.H. Bustamante, unpublished).

as template. This PCR product was digested with NcoI and HindIII restriction enzymes, purified and cloned into the vector pBADMyHisA digested with the same restriction enzymes. The pBAD-H-NS-FH plasmid expresses H-NS fused to 3XFLAG and 6XHis (H-NS-FH) from an arabinose-inducible promoter. To construct the pT6-H-NS-G113D plasmid, the G113D *hns* mutant allele was amplified by PCR using the primers *hns*-Nco and *hns*-22R and chromosomal DNA from the *E. coli* HM52 strain⁶⁷ as template. The resulting PCR product was digested with NcoI and HindIII, purified and ligated into the pMPM-T6Ω vector⁸⁴ digested with the same restriction enzymes. The pT6-HNS-G113D plasmid expresses H-NS^{G113D} under an arabinose-inducible promoter. To construct the pK3-GrhD1 and pK3-GrhD1-FLAG plasmids, the *grhD1* gene was amplified by PCR using the primers 1872Fw-K3 and 1872Rv-K3, and chromosomal DNA from the WT and DTM106 (*grhD1::3XFLAG*) *S. Typhimurium* strains, respectively, as template. The PCR products were digested with KpnI and SacI restriction enzymes, purified and ligated into the pMPM-K3 vector digested with the same restriction enzymes. Plasmids pK3-GrhD1 and pK3-GrhD1-FLAG express GrhD1 and GrhD1-FLAG, respectively, from the vector *lac* promoter. To construct the p2795-GrhD1-FLAG plasmid, the *grhD1* gene was amplified by PCR using the primers 1872-SalIFw and 1872Rv-3, and chromosomal DNA from the *S. Typhimurium* DTM106 strain (*grhD1::3XFLAG*) as template. The PCR products were digested with BamHI and SalI restriction enzymes, purified and ligated into the p2795 vector⁸⁵ digested with the same restriction enzymes.

Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assays. The CAT specific activity was determined as described previously⁸⁶.

Construction of deletion mutant strains and strains expressing FLAG-tagged proteins. The *grhD1* and *phoP* genes were replaced with a selectable kanamycin resistance cassette in the *S. Typhimurium* SL1344 strain by the λRed recombinase system, as reported previously⁸⁷, thus generating the DTM101 (*ΔgrhD1::kan*) and DTM103 (*ΔphoP::kan*) strains. The chromosomal *grhD1* and *avrA* genes were FLAG-tagged in the *S. Typhimurium* SL1344 strain, using a previously reported method based on the λRed recombinase system⁸⁸, generating the DTM107 (*grhD1::3XFLAG-kan*) and DTM113 (*avrA::3XFLAG-kan*) strains. P22 transduction was used to transfer the *ΔhilD::kan* allele from JPTM5 into DTM104, generating the DTM105 strain, and to transfer the *grhD1::3XFLAG-kan* allele from DTM107 into JPTM25, DTM104, SV4198 and SV4235, generating the DTM109, DTM111, MD3883 and MD3870 strains, respectively. The kanamycin resistance cassette was excised from the DTM101, DTM103, DTM105, DTM107, DTM109 and DTM111 strains, by using helper plasmid pCP20, expressing the FLP recombinase, as described previously⁸⁷, generating the DTM102, DTM104, DTM106, DTM108, DTM110 and DTM112 strains, respectively. The complemented DTM114 strain (*ΔgrhD1 + grhD1::3XFLAG-kan*) was generated by inserting in *cis* the *grhD1::3XFLAG-kan* into the chromosome of the DTM102 strain (*ΔgrhD1*), using a previously reported method based on the λRed recombinase system⁸⁵ and the p2795-GrhD1-FLAG plasmid. All modified strains were verified by PCR amplification and sequencing.

Western blotting. Whole-cell extracts were prepared from samples of bacterial cultures and analyzed by Western blot as described previously⁸². Antibodies anti-FLAG M2 (Sigma) or anti-GroEL (StressGen) were used at 1:2 000 and 1:100 000 dilutions, respectively. The secondary antibodies Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit (Pierce) were used at a dilution of 1:10 000. Reaction bands on membranes were developed with the Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer) and the exposition to Kodak X-Omat films.

Protein secretion analysis. Protein secretion assays were performed as described previously⁸³.

Expression and purification of MBP-HilD. The maltose binding protein (MBP)-HilD was expressed and purified from *E. coli* BL21/DE3 containing the pMAL-HilD1 plasmid, using an amylose affinity column, as described previously²³.

Expression and purification of PhoP-H6. The His-tagged fusion protein PhoP-H6 was expressed in *E. coli* BL21/DE3 carrying the pPB1020 plasmid and purified by using a Ni²⁺-NTA-agarose affinity column, as described previously⁸⁹.

Expression and purification of H-NS-FH. The His-tagged fusion protein H-NS-FH was expressed in *E. coli* BL21/DE3 containing the pBAD-H-NS-FH plasmid and purified by using a Ni²⁺-NTA-agarose affinity column, as described previously²³.

Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs). For EMSAs with MBP-HilD or H-NS-FH, the upstream regions of *hilA*, *sigD*, *grhD1* and *ssrAB* were amplified by PCR using the combination of primers *hilA*1FBamHI/*hilA*2RHindIII, SigDBHIF/SigDH3R, 1872Fw-1/1872Rv-2 (or 1872Fw-1/1872Rv-3) and SsaBFBgII/SsrBRS6E, respectively. The generated PCR products were purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Binding reactions were performed by mixing each PCR product (≈100 ng) with increasing concentrations of purified MBP-HilD or H-NS-FH in binding buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 5% glycerol and 10 μg/ml bovine serum albumin (BSA), in a total volume of 20 μl. These reactions were incubated at room temperature for 20 min and then analyzed by electrophoresis on 6% nondenaturing acrylamide gels run with 0.5X Tris-borate-EDTA buffer, at room temperature. The DNA fragments were visualized by staining with ethidium bromide, in an Alpha-Imager UV transilluminator (Alpha Innotech Corp.).

For EMSAs with PhoP-H6, the primers that anneal to the coding strand of the promoters analyzed were labeled with T4 polynucleotide kinase and [³²P] ATP. The promoter regions of *grhD1*, *orgB*, *ges*, and *nucA* were amplified by PCR using primer pairs *stm1939 Fwd/stm1939 rv*, *orgB PE 3/PROM 2869*, *ges1/ges2*, and *nucA FW*

nuclease RV, respectively. Approximately 6 fmol of labeled promoter region DNA in a 20- μ l volume was incubated at room temperature for 30 min with the indicated amounts of purified PhoP-H6 protein, which was previously phosphorylated by incubation for 3 h at 25 °C with 25 mM acetyl phosphate as reported⁹⁰. The binding buffer used for protein-DNA incubations contained 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol, and 25 μ g/ml BSA. Samples were separated in an 8% nondenaturing Tris-borate-EDTA-polyacrylamide gel at room temperature. After electrophoresis, the gel was dried and analyzed in a Typhoon FLA 7000 IP laser scanner.

Motility assays. *Salmonella* strains were grown overnight at 37 °C with appropriate antibiotics. Then, the strains were sub-cultured 1:100 in fresh LB and grown at 37 °C with shaking until an OD₆₀₀ ~ 1. At this point, 1 μ l of each culture was spotted onto LB 0.3% agar plates and allowed to dry for 3 min at room temperature. Plates were incubated for 7 h at 37 °C and the diameter of the motility haloes was measured.

Cell infection assays. Invasion of HeLa cells or RAW264.7 macrophages was tested by gentamicin assays as previously described^{69,82}. Monolayers of HeLa cells or RAW264.7 macrophages were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 40:1 and 10:1 (bacteria to eukaryotic cells), respectively. In some experiments, monolayers were centrifuged at 1000 g for 10 min immediately after addition of the bacteria and then incubated for 10 min at 37 °C. To test the intracellular replication/survival, the monolayers of HeLa cells or RAW264.7 macrophages were further incubated with DMEM containing 10 μ g/ml gentamicin up to the indicated times. After removing the DMEM, the cells were lysed at 1, 4, 8, and 16 h post-infection in 1 ml or 200 μ l of 0.2% (w/v) sodium deoxycholate in 1X PBS for HeLa cells and RAW264.7 macrophages, respectively. Serial dilutions of the cell lysates were plated onto LB agar containing streptomycin at 100 μ g/ml. To evaluate invasion, the CFUs were counted at 1 h post-infection; to test intracellular replication/survival, the CFUs were enumerated at 4, 8, or 16 h post-infection. Fold-replication represents the CFUs recovered at 4, 8, or 16 h relative to the CFUs at 1 h post-infection.

The fibroblast cell line NRK-49F (ATCC CRL-1570) of rat origin, were propagated in DMEM containing 10% (v/v) fetal bovine serum, as described previously⁹¹. For the invasion assay, bacteria were grown at 37 °C in static non-aerated cultures obtained upon inoculation of 2 ml of LB with a bacterial colony and subsequent overnight incubation (final OD₆₀₀ ~ 1.0). Infection was carried out for either 10 or 20 min using a MOI of 10:1, as previously described⁹¹. After extensive washing, fibroblasts were incubated in fresh tissue culture medium containing 100 μ g/ml gentamicin up to 2 h post-infection. At that time, fibroblasts were lysed in 1X PBS pH 7.4, 1% (v/v) Triton X-100. Number of viable intracellular bacteria was determined by plating.

Mouse infection experiments. Animal manipulation in this work was carried out according to the standard and operating protocols approved by the Internal Committee for Animal Care and Use from CICUAL-UNAM, and by the Official Mexican Norm NOM-062Z00-1999. Pathogen-free BALB/c mice (6- to 7-week-old) were obtained from the Experimental Medicine Research Unit, School of Medicine, UNAM, Mexico. Groups of four animals were maintained in different ventilated cages. Water and food were withdrawn 4 h before treatment of mice with 50 mg of streptomycin by orogastric administration; then, animals were supplied with water and food ad libitum. For infection, overnight cultures of the *Salmonella* strains were diluted 1:100 in 5 ml of fresh LB and incubated at 37 °C with shaking for 3 h. After 24 h of the streptomycin treatment, water and food were withdrawn again for 4 h before the infection of mice with 50 μ l of a bacterial suspension containing 1 \times 10⁸ CFUs/ml in 1X PBS, or the administration of 50 μ l of sterile 1X PBS (control). Thereafter, drinking water and food were offered to the animals ad libitum. At 48 h post-infection, the animals were euthanized with an overdose of the anesthetics

Ketamine plus Xylazine administrated intraperitoneally, in a workstation hood (Thermo-Scientific). The spleen, cecum and terminal ileum were aseptically removed, weighed and homogenized in 1 ml of sterile and cold 1X PBS. To evaluate infiltration of neutrophils, samples of the cecum contents were analyzed by microscopy to determine the number of neutrophils and total eukaryotic cells from 15 different fields, using the Diff-Quick staining method and an inverted microscope Nikon TE300 (objective 60X). To analyze bacterial colonization, 2% Triton X-100 was added to the organ homogenizates and CFUs were determined by plating serial dilutions of the obtained cell lysates onto LB agar containing streptomycin at 100 μ g/ml.

Statistical analysis. Data were analyzed with the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Inc., San Diego, CA) using two-tailed Student's *t*-test. *P* values of <0.05 were considered significant.

References

- Ochman, H., Lawrence, J. G. & Groisman, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**, <https://doi.org/10.1038/35012500> (2000).
- Schmidt, H. & Hensel, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **17**, 14–56 (2004).
- Ilyas, B., Tsai, C. N. & Coombes, B. K. Evolution of *Salmonella*-host cell interactions through a dynamic bacterial genome. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, 428, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00428> (2017).
- Haraga, A., Ohlson, M. B. & Miller, S. I. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nature Rev Microbiol* **6**, 53 (2008).
- Ohl, M. E. & Miller, S. I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med* **52**, 259–274 (2001).
- Marcus, S. L., Brumell, J. H., Pfeifer, C. G. & Finlay, B. B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* **2**, 145–156 (2000).
- Porwollik, S. & McClelland, M. Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infect* **5**, 977–989 (2003).
- Fábrega, A. & Vila, J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev* **26**, 308–341 (2013).
- Groisman, E. A. & Ochman, H. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* **5**, 343–349 (1997).
- Hansen-Wester, I. & Hensel, M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* **3**, 549–559 (2001).
- Grant, A. J. *et al.* Attenuated *Salmonella* Typhimurium lacking the pathogenicity island-2 type 3 secretion system grow to high bacterial numbers inside phagocytes in mice. *PLoS Pathog* **8**, e1003070 (2012).

12. Núñez-Hernández, C., Alonso, A., Pucciarelli, M. G., Casadesús, J. & García-del Portillo, F. Dormant intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium discriminates among *Salmonella* pathogenicity island 2 effectors to persist inside fibroblasts. *Infect Immun* **82**, 221–232 (2014).
13. Bispham, J., Tripathi, B., Watson, P. & Wallis, T. *Salmonella* Pathogenicity island 2 influences both systemic salmonellosis and *Salmonella*-induced enteritis in calves. *Infect Immun* **69**, 367–377 (2001).
14. Coburn, B., Li, Y., Owen, D., Vallance, B. A. & Finlay, B. B. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* **73**, 3219–3227 (2005).
15. Coombes, B. K. *et al.* Analysis of the contribution of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 to enteric disease progression using a novel bovine ileal loop model and a murine model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* **73**, 7161–7169, <https://doi.org/10.1128/iai.73.11.7161-7169.2005> (2005).
16. Knodler, L. A. *et al.* Dissemination of invasive *Salmonella* via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 17733–17738 (2010).
17. Laughlin, R. C. *et al.* Spatial segregation of virulence gene expression during acute enteric infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *MBio* **5**, e00946–00913 (2014).
18. Cirillo, D. M., Valdivia, R. H., Monack, D. M. & Falkow, S. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* **30**, 175–188 (1998).
19. Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S. & Hensel, M. Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol* **31**, 1759–1773 (1999).
20. Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. & Hinton, J. C. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **47**, 103–118 (2003).
21. Brown, N. F. *et al.* *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS Pathog* **1**, e32 (2005).
22. Lundberg, U., Vinatzer, U., Berdnik, D., von Gabain, A. & Baccarini, M. Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol* **181**, 3433–3437 (1999).
23. Bustamante, V. H. *et al.* HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 14591–14596, <https://doi.org/10.1073/pnas.0801205105> (2008).
24. Kröger, C. *et al.* An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Cell Host Microbe* **14**, 683–695 (2013).
25. Miao, E. A. & Miller, S. I. A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 7539–7544 (2000).
26. Schechter, L. M., Damrauer, S. M. & Lee, C. A. Two AraC/XylS family members can independently counteract the effect of repressing sequences upstream of the *hilA* promoter. *Mol Microbiol* **32**, 629–642 (1999).
27. Lostroh, C. P., Bajaj, V. & Lee, C. A. The *cis* requirements for transcriptional activation by HilA, a virulence determinant encoded on SPI-1. *Mol Microbiol* **37**, 300–315 (2000).
28. Lostroh, C. P. & Lee, C. A. The HilA box and sequences outside it determine the magnitude of HilA-dependent activation of P *prgH* from *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol* **183**, 4876–4885 (2001).
29. Schechter, L. M. & Lee, C. A. AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella typhimurium* *hilA* promoter. *Mol Microbiol* **40**, 1289–1299 (2001).
30. Ellermeier, C. D., Ellermeier, J. R. & Schlauch, J. M. HilC, HilD 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 (2005).
31. Golubeva, Y. A., Sadik, A. Y., Ellermeier, J. R. & Schlauch, J. M. Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *Genetics* **190**, 79–90 (2012).
32. Saini, S., Ellermeier, J. R., Schlauch, J. M. & Rao, C. V. The role of coupled positive feedback in the expression of the SPI1 type three secretion system in *Salmonella*. *PLoS Pathog* **6**, e1001025 (2010).
33. Olekhnovich, I. N. & Kadner, R. J. DNA-binding activities of the HilC and HilD virulence regulatory proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**, 4148–4160 (2002).
34. Olekhnovich, I. N. & Kadner, R. J. 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 (2007).
35. Thijs, I. M. *et al.* Delineation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulon through genome-wide location and transcript analysis. *J Bacteriol* **189**, 4587–4596 (2007).
36. Main-Hester, K. L., Colpitts, K. M., Thomas, G. A., Fang, F. C. & Libby, S. J. Coordinate regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **76**, 1024–1035 (2008).
37. Cordero-Alba, M. & Ramos-Morales, F. Patterns of expression and translocation of the ubiquitin ligase SlrP in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **196**, 3912–3922 (2014).
38. Mouslim, C. & Hughes, K. T. The effect of cell growth phase on the regulatory cross-talk between flagellar and Spi1 virulence gene expression. *PLoS Pathog* **10**, e1003987 (2014).
39. Petrone, B. L., Stringer, A. M. & Wade, J. T. Identification of HilD-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **196**, 1094–1101 (2014).
40. Singer, H. M., Kühne, C., Deditius, J. A., Hughes, K. T. & Erhardt, M. The *Salmonella* Spi1 virulence regulatory protein HilD directly activates transcription of the flagellar master operon *flhDC*. *J Bacteriol* **196**, 1448–1457 (2014).
41. Colgan, A. M. *et al.* 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 (2016).
42. Martínez-Flores, I. *et al.* *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, <https://doi.org/10.1038/srep37858> (2016).
43. Smith, C., Stringer, A. M., Mao, C., Palumbo, M. J. & Wade, J. T. Mapping the regulatory network for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion. *MBio* **7**, e01024–01016 (2016).
44. Martínez, L. C., Banda, M. M., Fernández-Mora, M., Santana, F. J. & Bustamante, V. H. HilD induces expression of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes by displacing the global negative regulator H-NS from *ssrAB*. *J Bacteriol* **196**, 3746–3755 (2014).
45. Fass, E. & Groisman, E. A. Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol* **12**, 199–204 (2009).
46. Miller, S. I., Kukral, A. M. & Mekalanos, J. J. A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5054–5058 (1989).
47. Groisman, E. A., Chiao, E., Lipps, C. J. & Heffron, F. *Salmonella typhimurium phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 7077–7081 (1989).
48. Groisman, E. A. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* **183**, 1835–1842 (2001).
49. Prost, L. R. *et al.* Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH. *Mol Cell* **26**, 165–174 (2007).
50. Bader, M. W. *et al.* Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. *Mol Microbiol* **50**, 219–230 (2003).
51. Bader, M. W. *et al.* Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* **122**, 461–472 (2005).
52. Prost, L. R. & Miller, S. I. The *Salmonellae* PhoQ sensor: mechanisms of detection of phagosome signals. *Cell Microbiol* **10**, 576–582 (2008).
53. Vescovi, E. G., Soncini, F. C. & Groisman, E. A. Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* **84**, 165–174 (1996).

54. Groisman, E. A. The ins and outs of virulence gene expression: Mg²⁺ as a regulatory signal. *Bioessays* **20**, 96–101 (1998).
55. Soncini, F. C., Vescovi, E. G., Solomon, F. & Groisman, E. A. Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes. *J Bacteriol* **178**, 5092–5099 (1996).
56. Aguirre, A. *et al.* PhoP-induced genes within *Salmonella* pathogenicity island 1. *J Bacteriol* **188**, 6889–6898 (2006).
57. Gunn, J. S., Ryan, S. S., Van Velkinburgh, J. C., Ernst, R. K. & Miller, S. I. Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **68**, 6139–6146 (2000).
58. Guo, L. *et al.* Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science* **276**, 250–253 (1997).
59. Ernst, R. K., Guina, T. & Miller, S. I. *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes Infect* **3**, 1327–1334, [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01494-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01494-0) (2001).
60. Adams, P. *et al.* Proteomic detection of PhoPQ-and acid-mediated repression of *Salmonella* motility. *Proteomics* **1**, 597–607 (2001).
61. Thompson, J. A., Liu, M., Helaine, S. & Holden, D. W. Contribution of the PhoP/Q regulon to survival and replication of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in macrophages. *Microbiology* **157**, 2084–2093 (2011).
62. Yu, J.-L. & Guo, L. Quantitative proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium under PhoP/PhoQ activation conditions. *J Proteome Res* **10**, 2992–3002 (2011).
63. Rico-Pérez, G. *et al.* A novel peptidoglycan D, L-endopeptidase induced by *Salmonella* inside eukaryotic cells contributes to virulence. *Mol Microbiol* **99**, 546–556 (2016).
64. Pontel, L. B., Audero, M. E. P., Espariz, M., Checa, S. K. & Soncini, F. C. GoIS controls the response to gold by the hierarchical induction of *Salmonella*-specific genes that include a CBA efflux-coding operon. *Mol Microbiol* **66**, 814–825, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007-05963.x> (2007).
65. Lucchini, S. *et al.* H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog* **2**, e81 (2006).
66. Navarre, W. W. *et al.* Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**, 236–238 (2006).
67. Ueguchi, C., Suzuki, T., Yoshida, T., Tanaka, K. & Mizuno, T. Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J Mol Biol* **263**, 149–162 (1996).
68. De la Cruz, M. A. *et al.* LeuO antagonizes H-NS and StpA-dependent repression in *Salmonella enterica* *ompS1*. *Mol Microbiol* **66**, 727–743 (2007).
69. Ibarra, J. A. *et al.* Induction of *Salmonella* pathogenicity island 1 under different growth conditions can affect *Salmonella*–host cell interactions *in vitro*. *Microbiology* **156**, 1120–1133, <https://doi.org/10.1099/mic.0.032896-0> (2010).
70. Barthel, M. *et al.* Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun* **71**, 2839–2858, <https://doi.org/10.1128/iai.71.5.2839-2858.2003> (2003).
71. Klein, J. R., Fahlen, T. F. & Jones, B. D. Transcriptional organization and function of invasion genes within *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 1, including the *prgH*, *prgI*, *prgJ*, *prgK*, *orgA*, *orgB*, and *orgC* genes. *Infect Immun* **68**, 3368–3376 (2000).
72. Day, J. B. & Lee, C. A. Secretion of the *orgC* gene product by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **71**, 6680–6685, <https://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6680-6685.2003> (2003).
73. Bajaj, V., Lucas, R. L., Hwang, C. & Lee, C. A. Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol* **22**, 703–714, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.d01-1718.x> (1996).
74. Baxter, M. A. & Jones, B. D. Two-component regulators control *hilA* expression by controlling *fimZ* and *hilE* expression within *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **83**, 978–985 (2015).
75. Hapfelmeier, S. *et al.* The *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow *Salmonella* serovar Typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *J Immunol* **174**, 1675–1685 (2005).
76. Srikumar, S. *et al.* RNA-seq brings new insights to the intra-macrophage transcriptome of *Salmonella* Typhimurium. *PLoS Pathog* **11**, e1005262 (2015).
77. Norte, V. A., Stapleton, M. R. & Green, J. PhoP-responsive expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *slyA* gene. *J Bacteriol* **185**, 3508–3514 (2003).
78. Navarre, W. W. *et al.* Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Mol Microbiol* **56**, 492–508 (2005).
79. Song, H. *et al.* Modulation of the regulatory activity of bacterial two-component systems by SlyA. *J Biol Chem* **283**, 28158–28168 (2008).
80. Zhao, G., Weatherspoon, N., Kong, W., Curtiss, R. & Shi, Y. A dual-signal regulatory circuit activates transcription of a set of divergent operons in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 20924–20929 (2008).
81. Headley, V. L. & Payne, S. M. Differential protein expression by *Shigella flexneri* in intracellular and extracellular environments. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 4179–4183 (1990).
82. Pérez-Morales, D. *et al.* The transcriptional regulator SsrB is involved in a molecular switch controlling virulence lifestyles of *Salmonella*. *PLoS Pathog* **13**, e1006497, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006497> (2017).
83. Martínez, L. C. *et al.* 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, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07674.x> (2011).
84. Mayer, M. P. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**, 41–46 (1995).
85. Husseiny, M. I. & Hensel, M. Rapid method for the construction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine carrier strains. *Infect Immun* **73**, 1598–1605 (2005).
86. Puente, J. L., Bieber, D., Ramer, S. W., Murray, W. & Schoolnik, G. K. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* **20**, 87–100, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02491.x> (1996).
87. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 6640–6645, <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297> (2000).
88. Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S. & Bossi, L. Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 15264–15269, <https://doi.org/10.1073/pnas.261348198> (2001).
89. Castelli, M. A., Vescovi, E. G. A. & Soncini, F. C. The phosphatase activity is the target for Mg²⁺ regulation of the sensor protein PhoQ in *Salmonella*. *J Biol Chem* **275**, 22948–22954, <https://doi.org/10.1074/jbc.M909335199> (2000).
90. Lejona, S. *et al.* PhoP can activate its target genes in a PhoQ-independent manner. *J Bacteriol* **186**, 2476–2480, <https://doi.org/10.1128/Jb.186.8.2476-2480.2004> (2004).
91. Aiastui, A., Pucciarelli, M. G. & García-del Portillo, F. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invades fibroblasts by multiple routes differing from the entry into epithelial cells. *Infect Immun* **78**, 2700–2713, <https://doi.org/10.1128/iai.01389-09> (2010).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM/México (IN203415) and from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)/México (254531) to V.H.B., from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness and European Regional Development Funds (FEDER) [BIO2013-46281-P and BIO2016-77639-P-(MINECO-FEDER)] to F.G.-dP., and from CONACYT/México (256263) to M.A.dC., F.C.S. is a career investigator of CONICET and of the Rosario National University Research Council (CIUNR). M.M.B. was supported by a pre-doctoral fellowship from CONACYT (403748). R.M.D. was supported by a master fellowship from CONACYT (367095). C.L. is a fellow of the National Scientific and Technical Research Council (CONICET). We thank D. Pérez-Morales for constructing the *pagK-cat* plasmid and for help during cell infection assays; A. Vázquez for constructing the DTM103 strain; F.J. Santana for constructing the pK3-PhoP plasmid; C. Zavala-Alvarado for purifying the H-NS-FH protein; M. Hensel for providing the p2795 vector; F.J. Santana, M. Fernández-Mora, D. Vences-Vences, A. López-Huerta and M. Martínez-Parrilla for technical assistance; I. Martínez-Flores for critical reading of the manuscript; as well as J.C.D. Hinton and J.L. Puente for sharing results from transcriptomics before publication.

Author Contributions

V.H.B., F.G.-dP., F.C.S., and M.A.dC. designed research; M.M.B., C.L., R.M., G.R.-P., P.G., R.R.-R., and M.A.dC. performed experimental research; M.M.B., C.L., R.M., G.R.-P., P.G., R.R.-R., M.A.dC., F.C.S., F.G.-dP., and V.H.B. analyzed data; and M.M.B. and V.H.B. wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23068-0>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Artículo sometido a la revista Scientific Reports:

HilD induces expression of a novel *Salmonella* Typhimurium invasion factor, GrhD2, through a regulatory cascade involving SprB

María M. Banda, Rubiceli Manzo & Víctor H. Bustamante*

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

Correspondence and requests for materials should be addressed to V.H.B. (email: victor@ibt.unam.mx)

**Artículos publicados de otros proyectos durante el
Doctorado**

RESEARCH ARTICLE

The transcriptional regulator SsrB is involved in a molecular switch controlling virulence lifestyles of *Salmonella*

Deyanira Pérez-Morales^{1☯✉}, María M. Banda^{1☯}, N. Y Elizabeth Chau^{2,3}, Heladia Salgado⁴, Irma Martínez-Flores⁴, J. Antonio Ibarra⁵, Bushra Ilyas^{2,3}, Brian K. Coombes^{2,3}, Víctor H. Bustamante^{1*}

1 Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, **2** Department of Biochemistry and Biomedical Sciences, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada, **3** Michael G. DeGroot Institute for Infectious Disease Research, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada, **4** Programa de Genómica Computacional, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, **5** Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

☯ These authors contributed equally to this work.

✉ Current address: CONACYT, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México.

* victor@ibt.unam.mx



OPEN ACCESS

Citation: Pérez-Morales D, Banda MM, Chau NYE, Salgado H, Martínez-Flores I, Ibarra JA, et al. (2017) The transcriptional regulator SsrB is involved in a molecular switch controlling virulence lifestyles of *Salmonella*. PLoS Pathog 13(7): e1006497. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006497>

Editor: Simon L. Dove, Children's Hospital Boston, UNITED STATES

Received: January 12, 2017

Accepted: June 28, 2017

Published: July 13, 2017

Copyright: ©2017 Pérez-Morales et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) / México (179071 and 254531 to VHB), from Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM / México (IN203415 to VHB), from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 82704 to BKC), from the

Abstract

The evolution of bacterial pathogenicity, heavily influenced by horizontal gene transfer, provides new virulence factors and regulatory connections that alter bacterial phenotypes. *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 (SPI-1 and SPI-2) are chromosomal regions that were acquired at different evolutionary times and are essential for *Salmonella* virulence. In the intestine of mammalian hosts, *Salmonella* expresses the SPI-1 genes that mediate its invasion to the gut epithelium. Once inside the cells, *Salmonella* down-regulates the SPI-1 genes and induces the expression of the SPI-2 genes, which favor its intracellular replication. The mechanism by which the invasion machinery is deactivated following successful invasion of host cells is not known. Here, we show that the SPI-2 encoded transcriptional regulator SsrB, which positively controls SPI-2, acts as a dual regulator that represses expression of SPI-1 during intracellular stages of infection. The mechanism of this SPI-1 repression by SsrB was direct and acts upon the *hilD* and *hilA* regulatory genes. The phenotypic effect of this molecular switch activity was a significant reduction in invasion ability of *S. enterica* serovar Typhimurium while promoting the expression of genes required for intracellular survival. During mouse infections, *Salmonella* mutants lacking SsrB had high levels of *hilA* (SPI-1) transcriptional activity whereas introducing a constitutively active SsrB led to significant *hilA* repression. Thus, our results reveal a novel SsrB-mediated mechanism of transcriptional crosstalk between SPI-1 and SPI-2 that helps *Salmonella* transition to the intracellular lifestyle.

Regulatory Evolution Drives Evasion of Host Inflammasomes by *Salmonella* Typhimurium

Bushra Ilyas,^{1,2} David T. Mulder,^{1,2} Dustin J. Little,^{1,2} Wael Elhenawy,^{1,2} María M. Banda,³ Deyanira Pérez-Morales,⁴ Caressa N. Tsai,^{1,2} N.Y.E. Chau,^{1,2} Víctor H. Bustamante,³ and Brian K. Coombes^{1,2,5,*}

¹Michael G. DeGroot Institute for Infectious Disease Research, McMaster University, Hamilton, ON, L8S 4L8, Canada

²Department of Biochemistry and Biomedical Sciences, McMaster University, Hamilton, ON, L8S 4L8, Canada

³Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

⁴CONACYT, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México

⁵Lead Contact

*Correspondence: coombes@mcmaster.ca

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.078>

SUMMARY

Bacterial two-component regulatory systems (TCS) couple the detection of niche-specific cues with adaptive gene expression to optimize fitness. In *Salmonella* Typhimurium (STM), the SsrA-SsrB TCS regulates virulence genes needed for survival within host cells, yet the impact of this TCS on regulatory evolution in this pathogen remains incompletely understood. Here, we show that SsrB alters a transcriptional network controlling bacterial motility to limit inflammasome activation during host cell infection. Using comparative RNA sequencing between STM and *S. bongori* (SBG) engineered to express SsrB, we show that SsrB represses flagellar gene expression in STM but activates this pathway in SBG, which has evolved in the absence of SsrB. Motility repression in STM is driven by an SsrB-binding region upstream of *flhDC* that appears to have evolved in STM following divergence from SBG. These data reveal a divergent regulatory circuit in non-coding DNA that reduces flagellar gene expression to evade host defenses.

INTRODUCTION

The evolution of *Salmonella* as a pathogen has been shaped prominently by genomic evolution via horizontal gene transfer. Horizontally acquired loci, called *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs), are differentially distributed in different strains and serovars and contribute to strain-specific traits. For example, the acquisition of SPI-2 following divergence of *S. enterica* from *S. bongori* conferred on *S. enterica* the ability to survive and replicate within immune cells (Jennings et al., 2017). Thus, the acquisition of SPI-2 allowed *S. enterica* serotypes to exploit new intracellular host niches, thereby expanding their pathogenic potential.

Co-inherited with SPI-2 was SsrA-SsrB, a two-component regulatory system (TCS) that controls the expression of SPI-2 genes following intracellular invasion. Under acidic conditions,

the SsrA sensor kinase phosphorylates the SsrB response regulator, which then binds to the regulatory region of target genes to regulate their expression directly, or through counter-silencing of H-NS (Mulder et al., 2015; Tomljenovic-Berube et al., 2010; Walthers et al., 2007, 2011). We and others have shown that genes outside SPI-2 have also been captured into the SsrB regulon through mutations in regulatory DNA (Osborne et al., 2009; Pérez-Morales et al., 2017; Tomljenovic-Berube et al., 2010; Worley et al., 2000). The optimized transcriptional output of these genes, in addition to that of the classical SPI-2 virulence genes, contributes to bacterial fitness within the host.

Many of the genes outside of SPI-2 that are controlled by SsrB have orthologs in *S. bongori* (SBG), which is interesting because SBG lacks SPI-2 and has evolved in the absence of SsrA-SsrB. Here, we used comparative transcriptomics between *S. Typhimurium* (STM) and SBG, engineered to express SsrB, to probe the extent to which SsrB has shaped the regulatory landscape in STM. We identified 396 orthologous *Salmonella* genes from 11 functional classes that were divergently regulated by SsrB in both species, including more than 100 genes of unknown function. One of these functional classes, bacterial motility, was systematically repressed by SsrB in STM but was activated in SBG. We demonstrate that the SsrB-mediated repression of flagellar-based motility is required to limit inflammasome activation during intracellular infection of macrophages.

RESULTS

Comparative RNA Sequencing Reveals Divergent Gene Regulation by SsrB

The SsrB response regulator is essential for *Salmonella* virulence because it controls expression of genes required for intracellular survival. To investigate the extent of regulatory rewiring in STM, we compared gene expression in the SsrB-naïve species, SBG, with that of an SsrB-adapted species, STM. We engineered a constitutively active SsrB variant (SsrB D56E) that does not require input from SsrA and expressed it in SBG and in STM Δ ssrAB. RNA extracted from SsrB-expressing strains (SsrB⁺) and from vector-controlled strains (SsrB⁻) was sequenced and analyzed by Rockhopper (McClure et al., 2013; Tjaden, 2015) (Data S1). Sequencing reached an average of ~10 million reads from three biological replicates per strain with ~150 × genome





SlyA and HilD Counteract H-NS-Mediated Repression on the *ssrAB* Virulence Operon of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Thus Promote Its Activation by OmpR

María M. Banda,^a Crispín Zavala-Alvarado,^a Deyanira Pérez-Morales,^b Víctor H. Bustamante^a

^aDepartamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

^bCONACYT, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México

ABSTRACT H-NS-mediated repression of acquired genes and the subsequent adaptation of regulatory mechanisms that counteract this repression have played a central role in the *Salmonella* pathogenicity evolution. The *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) is an acquired chromosomal region containing genes necessary for *Salmonella enterica* to colonize and replicate in different niches of hosts. The *ssrAB* operon, located in SPI-2, encodes the two-component system SsrA-SsrB, which positively controls the expression of the SPI-2 genes but also other many genes located outside SPI-2. Several regulators have been involved in the expression of *ssrAB*, such as the ancestral regulators SlyA and OmpR, and the acquired regulator HilD. In this study, we show how SlyA, HilD, and OmpR coordinate to induce the expression of *ssrAB* under different growth conditions. We found that when *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is grown in nutrient-rich lysogeny broth (LB), SlyA and HilD additively counteract H-NS-mediated repression on *ssrAB*, whereas in N-minimal medium (N-MM), SlyA antagonizes H-NS-mediated repression on *ssrAB* independently of HilD. Interestingly, our results indicate that OmpR is required for the expression of *ssrAB* independently of the growth conditions, even in the absence of repression by H-NS. Therefore, our data support two mechanisms adapted for the expression of *ssrAB* under different growth conditions. One involves the additive action of SlyA and HilD, whereas the other involves SlyA, but not HilD, to counteract H-NS-mediated repression on *ssrAB*, thus favoring in both cases the activation of *ssrAB* by OmpR.

IMPORTANCE The global regulator H-NS represses the expression of acquired genes and thus avoids possible detrimental effects on bacterial fitness. Regulatory mechanisms are adapted to induce expression of the acquired genes in particular niches to obtain a benefit from the information encoded in the foreign DNA, as for pathogenesis. Here, we show two mechanisms that were integrated for the expression of virulence genes in *Salmonella* Typhimurium. One involves the additive action of the regulators SlyA and HilD, whereas the other involves SlyA, but not HilD, to counteract H-NS-mediated repression on the *ssrAB* operon, thus favoring its activation by the OmpR regulator. To our knowledge, this is the first report involving the coordinated action of two regulators to counteract H-NS-mediated repression.

KEYWORDS H-NS, HilD, OmpR, SPI, *Salmonella*, SlyA, transcriptional regulation, *ssrAB*

Salmonella enterica serovar Typhimurium, a facultative intracellular pathogen, generally causes mild self-limiting gastroenteritis in humans and several animals, but it can also produce severe systemic infections in different hosts, including humans (1, 2). Thus, *S. Typhimurium* has been extensively used as a model for studying the molecular mechanisms governing *S. enterica* virulence (1, 3, 4).

Around one-quarter of the *S. Typhimurium* genome was shaped by the gain of DNA

Citation Banda MM, Zavala-Alvarado C, Pérez-Morales D, Bustamante VH. 2019. SlyA and HilD counteract H-NS-mediated repression on the *ssrAB* virulence operon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and thus promote its activation by OmpR. *J Bacteriol* 201:e00530-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00530-18>.

Editor Victor J. DiRita, Michigan State University

Copyright © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Víctor H. Bustamante, victor@ibt.unam.mx.

Received 29 August 2018

Accepted 26 January 2019

Accepted manuscript posted online 4 February 2019

Published 26 March 2019