



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Regulación de los genes *pdu* y *eut* por los sistemas BarA/SirA y Csr en *Salmonella*
Typhimurium

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Doctor en Ciencias

PRESENTA

M. en C. Jessica Nava Galeana

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Alfredo Martínez Jiménez
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dr. Rafael Peña Miller
[Centro de Ciencias Genómicas, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Octubre, 2023



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 UNAM.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. Rafael Peña Miller

(Centro de Ciencias Genómicas, UNAM)

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

Dra. Cinthia Ernestina Núñez López

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

(Centro de Ciencias Genómicas, UNAM)

Dr. Adrián Fernando Alvarez

(Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo

(Instituto de Fisiología Celular, UNAM)

Dra. Claudia Rodríguez Almazán

(Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, UNAM)

Este proyecto de investigación fue financiado con recursos del proyecto PAPIIT-DGAPA / UNAM no. IN206321. Durante mis estudios de doctorado recibí una beca del CONACyT (CVU no. 679158).

AGRADECIMIENTOS

Al Biol. Francisco Javier Santana Estrada, al M. en C. Marcos Fernández Mora, a la M. en C. Paulina Torres Rodríguez y a la Dra. Deyanira Pérez Morales, por el apoyo técnico brindado.

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

A la Unidad de Biblioteca del IBT, conformada por Shirley Elizabeth Ainsworth Gore y Jesús Omar Arriaga Pérez.

A la Unidad de docencia, conformada por Lidia Judith Martínez Carrera, J. Antonio Bolaños Guillen y Gloria Villa Herrera.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), por los fondos otorgados para mi asistencia al XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica de la SMB.

A CONACyT por mi beca para realizar mis estudios de doctorado (CVU no. 679158), así como a PAPIIT-DGAPA / UNAM (IN206321) por los recursos para el desarrollo de mi proyecto de investigación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Dedico esta tesis a mi madre, Alicia. Llegué hasta este momento y no me rendí para que dondequiera que te encuentres, estés orgullosa de mí. Solamente tengo excelentes recuerdos de ti y siempre me acompañaras en todos los logros que juntas alcancemos. A mi padre, Alejandro, por su gran apoyo y por verlo superar muchas circunstancias y seguir adelante. Gracias a ambos por su amor y cariño. A mis hermanos, Alicia e Irving, por su apoyo, hemos podido salir adelante juntos. Gracias por escucharme y por quererme tanto, estoy orgullosa de ser su hermana. A mi sobrina Isabella, eres la alegría de nuestra familia y te quiero demasiado.

A mis amigos, con especial cariño a Magdalena, Yitzel, Magali y Dania, porque me han ayudado de varias maneras a alcanzar esta meta en mi vida, gracias por escucharme, compartir conmigo y brindarme su amistad. Gracias a Deyanira, Alexis y Marcos (en el yuma), al grupo VB: Ramsés, Luis, Víctor, Mónica, Cynthia, Fernando, Dani, Xiomara y Adrián, también a Mariela y a Javier (adoptados del grupo VB), a Steph, Liliana, Álvaro y todos mis compañeros del laboratorio 2 y los demás amigos/colegas que han venido a hacer alguna tesis o estancia y que han compartido momentos con nosotros, como Jazmín, Edison, Lalo y Víctor (multiverso de Vics). A la Sra. Rebeca, Mariana y a Pavel por ayudarnos con el material del laboratorio, sin ustedes no podríamos avanzar eficientemente en nuestro trabajo. A mis roomies, Mitzi (y Gio), Fernando, Manuel y Luis, ¡por pasar momentos agradables con ustedes! A mis amigos del baile: Edalid, Gaby (x2), Marisela, Lilia, Ernesto, Juan, Paco, Esme y todos los demás. Agradezco también a mi amiga y coach Mary Naranjo por su apoyo incondicional, su compañía y sus palabras que me motivaron a seguir adelante.

A mi alumna Michelle, espero que mis enseñanzas no solamente te hayan servido para aplicar en el laboratorio, sino también de manera personal. Me siento muy contenta y orgullosa de que alcanzaras una meta más en tu vida y te graduaras de Bióloga. Siempre estarás presente en mi vida al ser mi primera alumna de tesis, muchas gracias.

Al Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán por ser realmente un gran tutor, enseñarme y apoyarme tanto durante mi doctorado. Por creer y confiar en mí desde que llegué hace unos años a su laboratorio. Gracias por los consejos, pláticas y revisiones hacía mi trabajo que me han ayudado tanto a madurar en mi carrera profesional.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Alfredo Martínez Jiménez y el Dr. Rafael Peña Miller, por sus comentarios durante cada examen para la mejora de mi proyecto y de mi formación académica.

A los miembros del jurado de tesis, la Dra. Cinthia Ernestina Núñez López, el Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos, el Dr. Adrián Fernando Alvarez, la Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo y la Dra. Claudia Rodríguez Almazán por sus comentarios para enriquecer mi trabajo.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. MARCO TEÓRICO.....	14
2.1 Generalidades de <i>Salmonella</i> y su importancia biológica.....	14
2.2 Mecanismo de patogénesis	15
2.3 Factores de virulencia.....	16
2.3.1 Flagelo.....	16
2.3.2 Adhesinas.....	17
2.3.3 Sistema de secreción tipo III (SST3)	17
2.3.4 Islas de patogenicidad (SPIs).....	18
2.3.4.1 SPI-1 y el regulador transcripcional HilD.....	18
2.4 Replicación luminal de <i>Salmonella</i> y transmisión	20
2.4.1 Genes <i>pdu</i>	22
2.4.2 Genes <i>eut</i>	25
2.4.3 Reguladores transcripcionales PdcR y EutR.....	27
2.5 Sistemas de regulación BarA/SirA y Csr	28
3. ANTECEDENTES	30
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo general	32
5.2 Objetivos específicos.....	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	37
6.2 Construcción de cepas mutantes y cepas que expresan proteínas etiquetadas con el epítipo 3XFLAG	37
6.3 Construcción de plásmidos.....	39
6.4 Preparación de células competentes para electroporación	39
6.5 Inmunodetección de proteínas mediante Western blot.....	40
6.6 Cuantificación de la actividad específica β -galactosidasa	41

6.7	Expresión y purificación de la proteína de fusión MBP-PocR.....	41
6.8	Ensayos de retardo en gel (EMSAs) de DNA	42
6.9	Ensayos de retardo en gel (EMSAs) de RNA	43
6.10	Análisis por citometría de flujo	43
6.11	Análisis estadístico	44
7.	RESULTADOS	45
7.1	SirA, CsrB/C y CsrA regulan la expresión de los genes <i>pdu</i> y <i>eut</i>	45
7.2	La regulación de los genes <i>pdu</i> y <i>eut</i> por la cascada SirA-CsrB/C-CsrA requiere la presencia de PocR o EutR.....	46
7.3	SirA, CsrB/C y CsrA regulan la expresión de PocR y EutR	47
7.4	SirA y CsrB/C regulan la expresión de <i>pdu</i> y <i>eut</i> en presencia de sus moléculas inductoras	50
7.5	CsrA se une a los transcritos de <i>pocR</i> , <i>pduA</i> y <i>eutS</i>	50
7.6	Los genes <i>pdu</i> y <i>eut</i> no se expresan de forma biestable.....	51
8.	DISCUSIÓN.....	54
9.	CONCLUSIONES.....	59
10.	PERSPECTIVAS.....	60
11.	REFERENCIAS	61
12.	ANEXO 1: Medios y soluciones.....	77
13.	ANEXO 2: Artículos publicados.....	80

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo de infección de <i>Salmonella</i>	16
Figura 2. Representación esquemática de los genes presentes en SPI-1.....	18
Figura 3. Modelo de regulación de SPI-1.....	20
Figura 4. Colonización intestinal de <i>Salmonella</i>	21
Figura 5. Generación de dos poblaciones de <i>S. Typhimurium</i> en el lumen intestinal.	22
Figura 6. Metabolismo del propanediol (PDL).....	24
Figura 7. Regulación de los operones <i>pdu</i> y <i>cbi-cob</i> en <i>S. Typhimurium</i>	24
Figura 8. Metabolismo de la etanolamina (EA).	26
Figura 9. Regulación del operón <i>eut</i>	27
Figura 10. Mecanismo de regulación de los sistemas BarA/SirA y Csr.	29
Figura 11. Los sistemas BarA/SirA y Csr regulan de manera opuesta la expresión de los genes de SPI-1 y los genes requeridos para la replicación en el lumen intestinal.	31
Figura 12. Representación esquemática de los operones <i>pdu</i> y <i>eut</i>	46
Figura 13. La cascada SirA-CsrB/C-CsrA regula la expresión de los genes <i>pdu</i> y <i>eut</i>	46
Figura 14. La cascada SirA-CsrB/C-CsrA requiere de PocR y EutR para regular la expresión de los genes <i>pdu</i> y <i>eut</i>	47
Figura 15. La cascada SirA-CsrB/C-CsrA regula la expresión de PocR y EutR.	48
Figura 16. La cascada SirA-CsrB/C-CsrA regula la expresión de <i>pocR</i> en ausencia de PocR.	49
Figura 17. SirA y CsrB/C regulan la expresión de los genes <i>pdu</i> y <i>eut</i> en presencia de sus moléculas inductoras.	50
Figura 18. CsrA se une específicamente a los transcritos de <i>pocR</i> , <i>pduA</i> y <i>eutS</i>	51
Figura 19. Los genes de SPI-1 se expresan de manera biestable.	52
Figura 20. Los genes <i>pdu</i> y <i>eut</i> no se expresan de manera biestable.	53
Figura 21. Modelo de la regulación de los genes <i>pocR/pdu/eut</i> y <i>hilD</i> (SPI-1) por los sistemas BarA/SirA y Csr y por otros mecanismos de regulación.	55
Figura 22. Predicción de la estructura de los transcritos <i>pocR</i> , <i>pduA</i> y <i>eutS</i>	56
Figura 23. Modelo del mecanismo de regulación de la cascada BarA/SirA-CsrB/C-CsrA sobre la expresión de los genes <i>pdu</i> y <i>eut</i>	59

Índice de tablas

Tabla 1. Cepas bacterianas usadas en este estudio	33
Tabla 2. Plásmidos usados en este estudio.....	34
Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este estudio.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp ^R	Resistente a ampicilina
DTT	Ditiotreitol
EMSA	Ensayo de retardamiento en gel
EA	Etanolamina
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Km ^R	Resistente a kanamicina
K_d	Constante de disociación
LB	Caldo lisogénico
LPS	Lipopolisacárido
MBP	Proteína de unión a maltosa
ONPG	o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
OD	Densidad óptica
PBS	Amortiguador de fosfatos salinos
PBST	Amortiguador de fosfatos salinos con tween
PDL	1,2-propanediol
SD	Secuencia Shine-Dalgarno
sRNA	RNA pequeño
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
SST3	Sistema de secreción tipo 3
SCV	Vacuolas contenedoras de <i>Salmonella</i>
Stp ^R	Resistente a estreptomicina
TCS	Sistema de dos componentes
TDTT	Amortiguador Tris-DTT
U	Unidades
WT	Cepa silvestre

RESUMEN

Los patógenos entéricos como *Salmonella* han evolucionado para prosperar en el intestino inflamado. Los genes localizados en la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI-1) median la invasión a las células del epitelio intestinal y la inducción de una respuesta inflamatoria intestinal. De manera interesante, en el intestino se producen dos subpoblaciones de *Salmonella*: una subpoblación expresa a los genes de SPI-1 (SPI-1^{ON}), la cual invade al epitelio intestinal y genera una respuesta inflamatoria en el hospedero, mientras que la otra subpoblación no expresa a los genes de SPI-1 (SPI-1^{OFF}) y se replica en el lumen intestinal. A esta expresión diferencial en dos subpoblaciones se le conoce como expresión biestable. En el intestino inflamado se producen diferentes aceptores de electrones, como el tetrionato, los cuales utiliza *Salmonella* para la replicación luminal a través del metabolismo del propanediol y la etanolamina, usando las enzimas codificadas en los genes *pdu* y *eut*, respectivamente. CsrA es una proteína de unión a RNA que regula negativamente la expresión de HilD, el cual es el regulador transcripcional de los genes de SPI-1. Estudios previos sugieren que CsrA también regula la expresión de los genes *pdu* y *eut*, sin embargo, no se conoce el mecanismo de esta regulación. En este trabajo mostramos que CsrA regula positivamente la expresión de los genes *pdu* mediante la unión a los transcritos *pocR* y *pduA*, mientras que regula positivamente a los genes *eut*, mediante la unión al transcrito *eutS*. Además, nuestros resultados mostraron que la cascada de regulación SirA-CsrB/CsrC-CsrA controla la expresión de los genes *pdu* y *eut* mediada por PocR o EutR, los cuales son reguladores transcripcionales de la familia AraC que controlan positivamente la expresión de los genes *pdu* y *eut*, respectivamente. Asimismo, nuestros resultados indican los genes *pdu* y *eut* no se expresan de forma biestable. En conjunto, nuestro estudio proporciona nuevo conocimiento sobre los mecanismos de regulación que controlan la colonización intestinal por *Salmonella*.

ABSTRACT

Enteric pathogens such as *Salmonella* have evolved to thrive in the inflamed gut. Genes located within the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) mediate invasion of cells from the intestinal epithelium and the induction of an intestinal inflammatory response. Interestingly, in the intestine two *Salmonella* subpopulations are generated: one subpopulation expresses the SPI-1 genes (SPI-1^{ON}), which invade the intestinal epithelium and generate the host inflammatory response, while the other subpopulation does not express the SPI-1 genes (SPI-1^{OFF}) but replicates in the intestinal lumen. This differential expression in two subpopulations is known as bistable expression. Alternative electron acceptors become available in the inflamed gut, like tetrathionate, which are utilized by *Salmonella* for luminal replication through the metabolism of propanediol and ethanolamine using the enzymes encoded by the *pdu* and *eut* genes, respectively. The RNA-binding protein CsrA negatively regulates the expression of HilD, the central transcriptional regulator of the SPI-1 genes. Previous studies suggest that CsrA also regulates the expression of the *pdu* and *eut* genes but the mechanism for this regulation is unknown. In this work, we show that CsrA positively regulates the *pdu* genes by binding to the *pocR* and *pduA* transcripts, while also positively regulates the *eut* genes by binding to the *eutS* transcript. Furthermore, our results show that the SirA-CsrB/CsrC-CsrA regulatory cascade controls the expression of the *pdu* and *eut* genes mediated by PocR or EutR, the positive AraC-like transcriptional regulators for the *pdu* and *eut* genes, respectively. Additionally, our results indicate that the *pdu* and *eut* genes are not expressed in a bistable fashion. Overall, our study provides new insight about the regulatory mechanisms controlling *Salmonella* intestinal colonization.

1. INTRODUCCIÓN

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) causa infecciones gastrointestinales en humanos y en animales (Bäumler et al., 1998). Para la colonización intestinal de *S. Typhimurium* se requieren dos grupos de genes: los genes de SPI-1 (“*Salmonella* Pathogenicity Island 1”) y los genes *pdu* y *eut*. Los genes de SPI-1 codifican para proteínas que forman un sistema de secreción tipo 3 (SST3-1), proteínas efectoras, chaperonas y reguladores transcripcionales, los cuales participan en la invasión de *Salmonella* a las células del epitelio intestinal y favorecen la inflamación intestinal (Fàbrega & Vila, 2013). Los genes *pdu* y *eut* codifican las enzimas necesarias para el crecimiento de *Salmonella* en presencia de propanediol y etanolamina, respectivamente, las cuales son fuentes de carbono no fermentables que son metabolizadas por esta bacteria en el intestino inflamado mediante la respiración por tetrionato (Faber et al., 2017; Price-Carter et al., 2001; Thiennimitr et al., 2011; Winter et al., 2010). Los genes de SPI-1 se expresan cuando *Salmonella* se crece en medio LB (Bustamante et al., 2008; Sridhar & Steele-Mortimer, 2016), de forma biestable (en dos poblaciones SPI-1^{ON} y SPI-1^{OFF}) (Ackermann et al., 2008; Diard et al., 2013; Hautefort et al., 2003; Sánchez-Romero & Casadesús, 2018; Sturm et al., 2011). Por otra parte, los genes *pdu* y *eut* se expresan a bajos niveles en LB; sin embargo, la expresión de los genes *pdu* y *eut* se induce en presencia de propanediol y etanolamina, respectivamente (Chen et al., 1995; Roof & Roth, 1992).

Entre los diversos reguladores globales que controlan la expresión de los genes de SPI-1 se encuentran el sistema de dos componentes BarA/SirA y el sistema Csr (Fàbrega & Vila, 2013). El sistema BarA/SirA activa la expresión de *csrB* y *csrC*, que codifican para los RNA pequeños CsrB y CsrC (CsrB/C), los cuales se unen a la proteína de unión a RNA CsrA (Martínez et al., 2011; Zere et al., 2015). CsrB/C tienen varios sitios de unión de CsrA; así, al expresarse, CsrB/C capturan a CsrA, liberando la regulación postranscripcional que esta proteína ejerce sobre múltiples genes (Vakulskas et al., 2015). CsrA principalmente reprime la traducción de sus RNA mensajeros (RNAm) blanco, uniéndose sobre la secuencia Shine-Dalgarno (SD), lo cual los lleva a degradación; aunque también puede favorecer la traducción y/o estabilidad de algunos RNAm, activando así su traducción (Vakulskas et al., 2015). CsrA inhibe la expresión del regulador transcripcional tipo AraC, HilD, el cual activa la expresión de los genes de SPI-1: CsrA se une al RNAm de *hilD* y bloquea su traducción, mientras que el sistema BarA/SirA activa la expresión de CsrB/C que antagonizan el efecto de CsrA, favoreciendo la expresión de *hilD* (Hung et al., 2019; Martínez et al., 2011).

La expresión de los genes *pdu* y *eut* es positivamente controlada por los reguladores transcripcionales tipo AraC, PocR y EutR, respectivamente (Chen et al., 1995; Roof & Roth, 1992). Además, estudios realizados en nuestro grupo, así como otros estudios previos sugieren que los sistemas BarA/SirA y Csr también controlan la expresión de

los genes *pdu*, *pocR* y *eut* (Lawhon et al., 2003; Nava-Galeana et al., 2023a; Potts et al., 2019). Por ello, en este proyecto nos planteamos determinar de qué manera los sistemas BarA/SirA y Csr controlan la expresión de los genes *pdu* y *eut*, así como determinar si la expresión de los genes *pdu* y *eut* es biestable.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de *Salmonella* y su importancia biológica

Salmonella pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, la cual incluye a bacterias Gram-negativas en forma de bacilo, anaerobias facultativas, no formadoras de esporas, la mayoría es no fermentadora de lactosa y con movilidad peritrica, cuyo tamaño es de 0.7-1.5 μm de diámetro y 2-5 μm de largo (Fàbrega & Vila, 2013; Jajere, 2019). El género *Salmonella* se divide en dos especies: *S. bongori* y *S. enterica*; esta última se divide en 6 subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV), e *indica* (VI). En conjunto, las dos especies *Salmonella* conforman más de 2600 serovariedades, con base a los antígenos de superficie O (LPS), H (flagelar) y K (capsular) (Grimont & Weill, 2007; Issenhuth-Jeanjean et al., 2014; Jajere, 2019).

La subespecie *enterica* es responsable del 99% de infecciones por *Salmonella* en humanos y animales de sangre caliente, mientras que las otras cinco subespecies, así como la especie *S. bongori*, se encuentran escasamente en los humanos, pero se encuentran en animales de sangre fría y en el medio ambiente (Fookes et al., 2011; Giammanco et al., 2002; Jajere, 2019; Lamas et al., 2018). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) generalmente produce infecciones gastrointestinales en humanos, aunque también puede generar infecciones sistémicas en personas inmunocomprometidas, así como causar ambos tipos de infecciones en diferentes animales hospederos, mientras que el serovar Typhi es un patógeno estricto de humanos que se caracteriza por generar infecciones sistémicas (Bäumler et al., 1998; Fàbrega & Vila, 2013).

El reservorio de *Salmonella* es el intestino de los humanos y de los animales; sin embargo, se puede encontrar en la carne, los huevos, los lácteos, los vegetales y el agua contaminados (Popa & Popa, 2021). La dosis infectiva que se ha reportado en algunos brotes puede ser tan alta como 10^7 - 10^9 bacterias, pero en algunos casos puede ser menos de 100; la dosis varía dependiendo de la cepa, la edad y la condición física de las personas, afectando mayormente a los niños, adultos y personas inmunocomprometidas (Kothary & Babu, 2001). Las infecciones con *Salmonella* representan un importante problema de salud mundial, ocasionan miles de muertes al año, incrementan el tiempo de hospitalización y los costos de tratamiento son altos, (Jajere, 2019; Majowicz et al., 2010). También representan un grave problema para la industria avícola y la ganadera, generando grandes pérdidas económicas (Forshell & Wierup, 2006). Aunado a esto, el aumento de aislados de *Salmonella* resistentes a los antibióticos, como las fluoroquinolonas y las cefalosporinas, dificultan en extremo el tratamiento de las infecciones que producen (Frye & Jackson, 2013; Jajere, 2019; Lamas et al., 2018; Popa & Popa, 2021).

2.2 Mecanismo de patogénesis

El mecanismo de entrada de *Salmonella* al hospedero es a través de la ingesta de alimento o de agua contaminados con esta bacteria (dos Santos et al., 2019; Fàbrega & Vila, 2013; Haraga et al., 2008). La primera barrera que encuentra *Salmonella* es el pH ácido del estómago, la cual supera a través de una respuesta a la tolerancia ácida, compuesta de proteínas de choque por estrés ácido y bombas de flujo que transportan los protones en exceso del citoplasma, entre otros mecanismos (Palmer & Slauch, 2017). Una vez que llega al intestino delgado, *Salmonella* debe atravesar la mucosa intestinal antes de adherirse a las células epiteliales. El sitio propicio para la invasión de *Salmonella* es la parte más distal de las placas de Peyer (que contienen células M), en el íleon terminal, antes de la válvula ileocecal (Carter & Collins, 1974; Fàbrega & Vila, 2013; Palmer & Slauch, 2017). En el modelo de ratón, *Salmonella* preferencialmente se adhiere y entra a las células M en las placas de Peyer, aunque la invasión también ocurre en las células intestinales no fagocíticas (Figura 1). Después de la adhesión, *Salmonella* inyecta sus proteínas efectoras dentro de las células hospederas, interfiriendo con las vías de transducción de señales de la célula intestinal, lo que conlleva a cambios en el citoesqueleto de actina. Como consecuencia, se producen ondulaciones en la membrana de la célula hospedera, similares a las formadas en las células fagocíticas, lo cual le permite a la bacteria introducirse dentro de estas células, en compartimentos denominados vacuolas contenedoras de *Salmonella*, SCV (“*Salmonella* containing vacuoles”), donde *Salmonella* sobrevive y se replica. Esto a su vez provoca la inducción de una respuesta inflamatoria por el hospedero y la producción de diarrea, ocasionando así una infección gastrointestinal (Fàbrega & Vila, 2013). Después, una fracción de estas SCV's se dirige a la parte basolateral del epitelio, liberándose así las bacterias en la submucosa, las cuales pueden ser fagocitadas por macrófagos, formándose nuevamente las SCV; también, *Salmonella* puede llegar a otras células fagocíticas como las células dendríticas, las cuales tienen proyecciones hacia el lumen intestinal (Figura 1). La supervivencia dentro de los macrófagos es crucial para que *Salmonella* se disemine a través del sistema linfático, alcanzando y colonizando otros órganos, como el hígado, el bazo y la vesícula biliar, produciendo así una infección sistémica que se caracteriza por la fiebre entérica, dolor abdominal y que puede causar la muerte por un choque séptico (Bäumler et al., 2011).

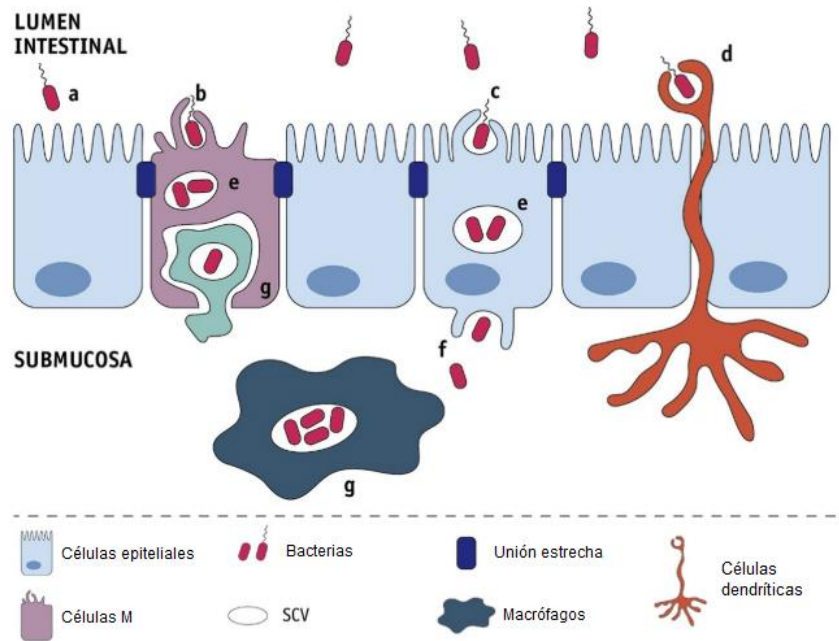


Figura 1. Mecanismo de infección de *Salmonella*. *Salmonella* se adhiere al epitelio intestinal o a las células M (a). *Salmonella* inyecta sus proteínas efectoras a través del SST3-1, causando rearrreglos en el citoesqueleto de actina, lo que genera ondulaciones en la membrana de las células hospederas (b,c). Adicionalmente, algunas bacterias pueden ser fagocitadas por células dendríticas que tienen proyecciones hacia el lumen intestinal (d). Una vez dentro del citoplasma, *Salmonella* se encuentra en vacuolas (SCV por “*Salmonella* containing vacuoles”) (e). Las SCV pueden dirigirse hacia la parte basolateral de la membrana y liberarse en la submucosa (f). Posteriormente, las bacterias pueden ser fagocitadas por macrófagos y localizarse en el citoplasma dentro de SCV (g) (Modificado de dos Santos et al., 2019).

2.3 Factores de virulencia

Salmonella posee diferentes estrategias de patogenicidad que emplea para causar las diferentes infecciones en sus hospederos. La mayoría de sus genes de virulencia se encuentran localizados en regiones del genoma denominadas islas de patogenicidad, mientras que otros se encuentran en plásmidos de virulencia o en otras regiones del cromosoma. Algunos de los factores de virulencia de esta bacteria incluyen el flagelo, las adhesinas y/o fimbrias, los sistemas de secreción tipo III, la cápsula y la biopelícula (dos Santos et al., 2019; Fàbrega & Vila, 2013; Jajere, 2019).

2.3.1 Flagelo

Los flagelos son filamentos helicoidales largos acoplados a motores rotatorios embebidos dentro de la membrana. Estos permiten el desplazamiento de *Salmonella* hacia sus diferentes nichos (de Jong et al., 2012). Estas estructuras están formadas por los productos de alrededor de 50 genes que facilitan su ensamblaje y función en respuesta a las condiciones ambientales (Chilcott & Hughes, 2000). La mayoría del género *Salmonella* contiene entre 5 a 10 flagelos posicionados aleatoriamente y que permiten su movilidad, exceptuando los serovares Gallinarum y Pullorum, que se

describen como no-motiles o no flagelados (Asten & Dijk, 2005). La movilidad por flagelos contribuye a la invasión de *Salmonella*, ya que permite el contacto con la célula hospedera y le ayuda a encontrar el sitio de infección óptimo (Misselwitz et al., 2012; Sánchez-Romero & Casadesús, 2021); por lo tanto, en la ausencia del sistema flagelar se afecta la colonización intestinal de *Salmonella* y la posterior inducción de la inflamación por el hospedero (Stecher et al., 2004; Winter et al., 2009).

2.3.2 Adhesinas

La adhesión entre *Salmonella* y la célula hospedera es indispensable para la colonización (Fàbrega & Vila, 2013). En *Salmonella* existen varios sistemas de adhesión: las adhesinas fimbriales y no fimbriales, las cuales difieren de acuerdo a sus mecanismos de ensamblaje; no obstante, también existen estructuras de superficie que, aunque su función no está involucrada en la adhesión (como el flagelo y el sistema de secreción tipo III), también contribuyen, en parte, a este proceso (Wagner & Hensel, 2011). Las adhesinas fimbriales son apéndices proteicos de superficie, entre los que se encuentran: 1) la fimbria tipo I, codificado en los genes *fimAICDHF*, 2) la fimbria curli o tafi (“thin aggregative fimbria”) codificada en los operones *csgBCA* y *csgDEFG*, 3) la fimbria Pef, cuyos genes *pef* se encuentran en el plásmido de virulencia pSLT y 4) la fimbria Std, codificada en el operón *std* (Fàbrega & Vila, 2013). Estas son importantes para la formación de la biopelícula, la colonización intestinal y la adhesión inicial a las células hospederas (dos Santos et al., 2019). Las adhesinas no fimbriales son un grupo heterogéneo de adhesinas que se secretan a través de un sistema de secreción tipo I, como SiiE y BapA, o se autotransportan a través de las membranas bacterianas, como ShdA, SadA o MisL (Fàbrega & Vila, 2013; Wagner & Hensel, 2011).

2.3.3 Sistema de secreción tipo III (SST3)

Los sistemas de secreción tipo III (SST3) son complejos proteicos que las bacterias utilizan para inyectar proteínas efectoras directamente al citoplasma de las células hospederas para modular varias respuestas del hospedero, como los rearrreglos en el citoesqueleto, la transducción de señales y la producción de citocinas (dos Santos et al., 2020). Los SST3 son factores de virulencia importantes en diversas bacterias patógenas de los humanos, por lo que se han considerado como un blanco terapéutico para el desarrollo de nuevos antimicrobianos (dos Santos et al., 2020).

Salmonella contiene dos SST3, codificados por genes presentes en dos diferentes regiones del genoma, conocidas como isla de patogenicidad de *Salmonella* 1 y 2 (SPI-1 y SPI-2, respectivamente) (Fàbrega & Vila, 2013; Haraga et al., 2008). El SST3 de SPI-1 (SST3-1) es activo durante el contacto de *Salmonella* con sus células hospederas y se requiere para la invasión de células no fagocíticas, la inducción de las respuestas inflamatorias del hospedero, la producción de diarrea y la colonización del intestino. Por otra parte, el SST3 de SPI-2 (SST3-2) se expresa dentro de las SCV y se

requiere para la supervivencia dentro de los macrófagos y para el establecimiento de la infección sistémica (Haraga et al., 2008).

2.3.4 Islas de patogenicidad (SPIs)

Durante la evolución, *Salmonella* ha adquirido un gran número de genes por transferencia horizontal, los cuales le han permitido adaptarse a diferentes hospederos. La mayoría de los genes de virulencia de *Salmonella* se encuentran en regiones del genoma denominadas islas de patogenicidad o SPIs (“*Salmonella* Pathogenicity Islands”) (Fàbrega & Vila, 2013). Las SPIs son grupos de genes involucrados en la virulencia, los cuales se caracterizan por tener una composición diferente de los nucleótidos G y C con respecto al promedio del genoma bacteriano, están flanqueadas por secuencias repetidas y usualmente contienen genes que codifican para transposasas, integrasas o secuencias de inserción (Jajere, 2019).

2.3.4.1 SPI-1 y el regulador transcripcional HilD

En SPI-1, de 40 kb, se encuentran 39 genes que codifican para las proteínas que forman el SST3-1, para proteínas efectoras y chaperonas, así como para los reguladores transcripcionales que activan la expresión de los genes de esta isla y de otros genes fuera de ella (Figura 2) (Que et al., 2013). A través del SST3-1, *Salmonella* inyecta diferentes proteínas efectoras hacia el citoplasma de sus células hospederas, las cuales modifican distintas rutas de transducción de señales que causan rearrreglos en el citoesqueleto, lo que favorece la invasión de *Salmonella* a las células del epitelio intestinal y la producción de diarrea (Fàbrega & Vila, 2013).

Los genes de SPI-1 se inducen cuando *Salmonella* se encuentra dentro del intestino de sus hospederos o en condiciones de laboratorio en medios ricos en nutrientes, como el medio LB, en una fase estacionaria temprana de crecimiento (Bustamante et al., 2008; Sridhar & Steele-Mortimer, 2016). Se piensa que el crecimiento de la bacteria en LB de alguna manera asemeja las condiciones que *Salmonella* encuentra en el intestino, ya que en ambas condiciones se favorece la expresión de los genes de SPI-1.

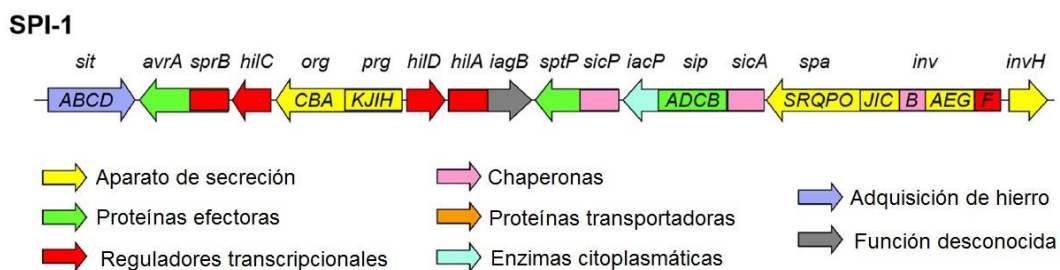


Figura 2. Representación esquemática de los genes presentes en SPI-1. Los colores representan las funciones descritas de los genes de SPI-1 (Modificado de Fàbrega & Vila, 2013).

Durante la evolución, en *Salmonella* se han adaptado diferentes mecanismos de regulación de expresión genética necesarios para la supervivencia de esta bacteria en diferentes nichos dentro de sus hospederos. La expresión de SPI-1, así como de genes relacionados a SPI-1, se controla por una compleja red de regulación que actúa a diferentes niveles (Figura 3) (Golubeva et al., 2012; Lou et al., 2019). Tres reguladores transcripcionales de la familia AraC/XylS, HilD y HilC, codificados en SPI-1, y RtsA, codificado en otra región del cromosoma, forman un circuito de retroalimentación que controla positivamente la expresión de los genes de SPI-1 (Ellermeier et al., 2005). Estos reguladores inducen la expresión genética contrarrestando la represión que ejerce la proteína asociada a nucleóide H-NS, principalmente sobre el promotor de *hilA* (Olekhovich & Kadner, 2007). En este circuito, HilD es el regulador dominante, mientras que HilC y RtsA amplifican la señal (Ellermeier et al., 2005). HilD induce la expresión de los genes de SPI-1 en cascada, induciendo directamente la expresión de HilA, el cual a su vez induce la expresión de InvF (Ellermeier et al., 2005; Fàbrega & Vila, 2013). HilA es un regulador transcripcional de la familia OmpR/ToxT que activa directamente la expresión de los operones de SPI-1 *prg/org* e *inv/spa*, los cuales codifican para las proteínas estructurales del SST3-1 y el regulador InvF (Bajaj et al., 1995; Fàbrega & Vila, 2013). InvF es miembro de la familia de reguladores AraC/XylS que activa la expresión de los operones de SPI-1 *sic/sip*, los cuales codifican para las proteínas efectoras del SST3-1 y la chaperona SicA (Ellermeier et al., 2005; Fàbrega & Vila, 2013; Romero-González et al., 2020).

Muchas señales regulatorias actúan sobre la expresión, la actividad o la concentración de HilD (Figura 3) (Golubeva et al., 2012; Lou et al., 2019; Saini et al., 2010). Por ejemplo, HilE inactiva a HilD a través de una interacción proteína-proteína, impidiendo su dimerización y su interacción con el DNA (Baxter et al., 2003; Grenz et al., 2018; Paredes-Amaya et al., 2018); la proteasa Lon degrada tanto a HilD como a HilC (Takaya et al., 2005); el regulador flagelar FliZ controla la actividad de HilD (Chubiz et al., 2010); los sistemas BarA/SirA y Csr controlan la traducción de *hilD* (Hung et al., 2019; Martínez et al., 2011).

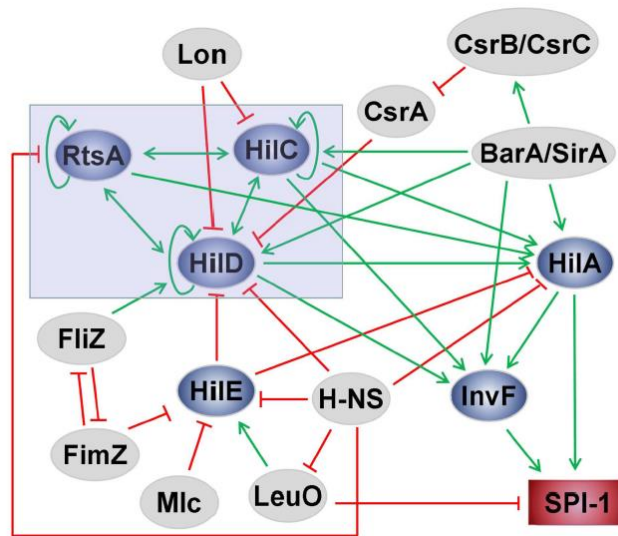


Figura 3. Modelo de regulación de SPI-1. Algunos mecanismos de regulación transcripcional y postranscripcional sobre el regulador HilD y los genes de SPI-1. Las flechas en verde indican activación y las líneas con extremos romos en rojo indican represión (Adaptado de Lou et al., 2019).

2.4 Replicación luminal de *Salmonella* y transmisión

Un factor importante de resistencia a la colonización intestinal por patógenos entéricos es la microbiota del intestino, la cual proporciona esta protección a través de diferentes mecanismos, incluyendo: la producción de compuestos antibacterianos, la competencia por nutrientes, la generación de un ambiente anaeróbico en el lumen al consumir el oxígeno y el mantenimiento del metabolismo energético de las células intestinales (Rivera-Chávez et al., 2016, 2017; Rivera-Chávez & Bäumler, 2015). Sin embargo, la inducción de la inflamación del intestino es un mecanismo que *Salmonella* emplea para desplazar a la microbiota intestinal (Lupp et al., 2007; Stecher et al., 2007; Winter et al., 2013). La expresión de la maquinaria de invasión de *Salmonella*, codificada en SPI-1, promueve la producción de citocinas pro-inflamatorias en la célula hospedera, lo que posteriormente conlleva a la infiltración de neutrófilos en el lumen intestinal que liberan especies reactivas de oxígeno (ROS), así como la producción de péptidos antimicrobianos que el hospedero utiliza para contener la infección (Rivera-Chávez & Bäumler, 2015). Las diferentes respuestas antimicrobianas producidas por el intestino inflamado eliminan a gran parte de la microbiota intestinal pero no a *Salmonella*, debido a que *Salmonella* cuenta con diferentes mecanismos para replicarse en estas condiciones (Figura 4) (Ilyas et al., 2017; Stecher et al., 2007): las ROS reaccionan con tiosulfato (un compuesto producido a partir de la oxidación del H₂S por la mucosa intestinal), generando tetracionato (alrededor de 3 mM en el intestino de ratones infectados con *Salmonella*), el cual *Salmonella* utiliza como aceptor de electrones en el ambiente anaeróbico intestinal, a través de las enzimas codificadas en el operón *ttr* (Winter et al., 2010). Además, en el intestino inflamado, *Salmonella* puede utilizar distintas fuentes de carbono que se encuentran disponibles en ese ambiente

como el propanediol y la etanolamina, mediante la respiración por tetrionato (Faber et al., 2017; Price-Carter et al., 2001; Thiennimitr et al., 2011; Winter et al., 2010). El propanediol, un subproducto generado por la microbiota intestinal (*Bacteroides thetaiotaomicron*) a partir del metabolismo de la ramnosa y fucosa (Staib & Fuchs, 2014), puede ser metabolizado por *Salmonella* debido a que contiene al operón *pdu* que codifica las enzimas necesarias para metabolizar el propanediol (Price-Carter et al., 2001). Asimismo, la etanolamina, producida a partir de la hidrólisis de la fosfatidiletanolamina, un glicerofosfolípido abundante en la membrana celular de los enterocitos, es también metabolizado por *Salmonella* a través de la expresión de las enzimas codificadas en el operón *eut* (Price-Carter et al., 2001; Thiennimitr et al., 2011). La primera enzima necesaria en el metabolismo de propanediol y etanolamina requiere de vitamina B₁₂ como cofactor, que *Salmonella* es capaz de sintetizar de manera anaeróbica mediante las enzimas que se encuentran codificadas en el operón *cbi-cob* (Price-Carter et al., 2001; Roth et al., 1996). En condiciones *in vitro* que mimetizan el ambiente intestinal se induce la expresión de proteínas involucradas en la utilización de propanediol y la síntesis de vitamina B₁₂ (Sonck et al., 2009), mientras que *in vivo* se ha descrito la importancia de la utilización del propanediol y la etanolamina para la expansión luminal de *Salmonella* (Faber et al., 2017; Harvey et al., 2011; Thiennimitr et al., 2011). Así, *Salmonella* emplea estas estrategias para superar a la microbiota intestinal y replicarse en el intestino inflamado, lo cual favorece la transmisión de este patógeno (Lawley et al., 2008; Stecher et al., 2007).

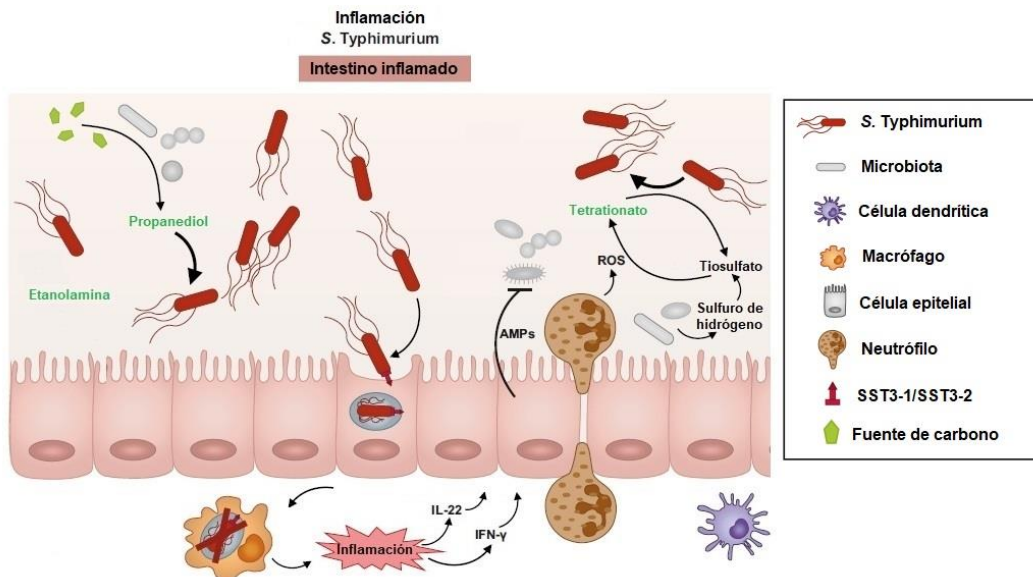


Figura 4. Colonización intestinal de *Salmonella*. A través de la expresión de los genes de SPI-1, *Salmonella* es capaz de invadir el epitelio intestinal, generando una respuesta inflamatoria del hospedero, que conlleva a la producción de citocinas proinflamatorias, la producción de péptidos antimicrobianos (AMPs), así como especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por los neutrófilos. Las ROS reaccionan con el tiosulfato, generando tetrionato, el cual *Salmonella* utiliza como aceptor de electrones durante el metabolismo del propanediol y la etanolamina (Modificado de Wotzka et al., 2017).

En el intestino, solo una parte de la población de *Salmonella* expresa los genes de SPI-1 a pesar de encontrarse en condiciones inductoras (Diard et al., 2013; Hautefort et al., 2003; Sturm et al., 2011). A la expresión diferencial de los genes de SPI-1 en dos poblaciones, una que los expresa y otra en la que no, se le conoce como expresión biestable (Smits et al., 2006). La población que expresan a SPI-1 (SPI-1^{ON}) invade el epitelio y genera inflamación intestinal, mientras que la población que no expresa a SPI-1 (SPI-1^{OFF}) aprovecha el nicho generado por la inflamación del intestino para replicarse en el lumen, para lo cual se requiere de la expresión de los genes *pdu*, *eut*, *cbi-cob* y *ttr* (Jakobson & Tullman-Ercek, 2016). De manera interesante, la mayoría de las bacterias que invaden el epitelio intestinal son eliminadas por el sistema inmune, pero las que sobreviven generan las condiciones para que las bacterias que no invaden proliferen en el lumen intestinal (Ackermann et al., 2008; Diard & Hardt, 2017). Por ende, existe un comportamiento cooperativo o de “división de labor” entre las poblaciones SPI-1^{ON} y SPI-1^{OFF} de *Salmonella* para la colonización intestinal (Figura 5); su replicación en el lumen intestinal favorece la transmisión de *Salmonella* hacia otros hospederos por la vía fecal-oral (Diard & Hardt, 2017; Lawley et al., 2008). Para esto es fundamental la regulación de la expresión, precisa y coordinada, de los genes de SPI-1 y *pdu/eut*.

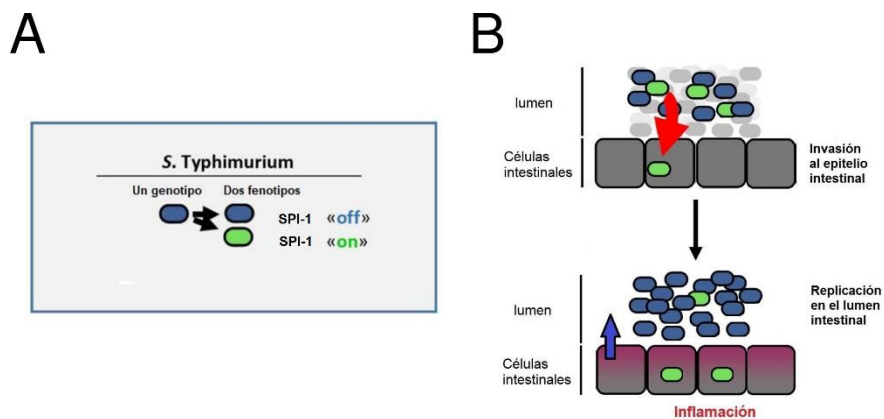


Figura 5. Generación de dos poblaciones de *S. Typhimurium* en el lumen intestinal. (A) Expresión biestable de los genes de SPI-1. (B) En el lumen intestinal, las bacterias que expresan a SPI-1 (mostradas en verde), son capaces de invadir al epitelio intestinal, mientras que las bacterias que no expresan a SPI-1 (mostradas en azul), sobreviven y se replican en el intestino inflamado, asegurando la transmisión de *Salmonella* (Modificado de Diard & Hardt, 2017).

2.4.1 Genes *pdu*

Se han descrito 23 genes *pdu* (“propanediol utilization”) que se requieren para la degradación de 1,2-propanediol (PDL), los cuales están ubicados en una misma región del cromosoma: *pocR*, *pduF* y *pduABCDEFGHIJKLMNQPSTUVWX* (Figura 6A) (Bobik et al., 1999; Sampson & Bobik, 2008; Staib & Fuchs, 2015; Sturms et al., 2015). La degradación de PDL involucra varios pasos enzimáticos (Figura 6B). Comienza con la conversión del 1,2-propanediol a propionaldehído a través de la enzima propanediol

deshidratasa codificada por los genes *pduCDE*. Esta reacción se lleva a cabo en estructuras denominadas microcompartimentos bacterianos, los cuales son similares a los carboxisomas y están formados por las proteínas codificadas en los genes *pduABJKNTU*. La función de los microcompartimentos es evitar que los compuestos tóxicos formados (aldehídos) afecten los procesos celulares, así como para mantener estos intermediarios volátiles, aunque también se ha sugerido que pueden proteger a la primera enzima de la presencia de oxígeno (Bobik et al., 1999; Kofoed et al., 1999; Ravcheev et al., 2019; Sampson & Bobik, 2008). Posteriormente, el propionaldehído se convierte en propionil-CoA por la enzima propionaldehído deshidrogenasa codificada en el gen *pduP*, o puede convertirse a propanol por la enzima 1-propanol deshidrogenasa codificada en el gen *pduQ*. El propanol puede excretarse por la célula, mientras que el propionil-CoA se procesa en el citoplasma, donde: 1) puede convertirse en propionil-fosfato por acción de las enzimas fosfato propanoiltransferasa (*pduL*) o fosfato acetiltransferasa (*pta*) y después en propionato por las enzimas propionato quinasa (*pduW* o *tdcD*) o acetato quinasa (*ackA*); 2) entrar a la vía del 2-metilcitrato a través de las enzimas codificadas por los genes *prp* (involucrados en el metabolismo del propionato) y al ciclo de Krebs, para finalmente generar ATP mediante la respiración aeróbica (oxígeno) o anaeróbica (tetrionato) (Bobik et al., 1999; Price-Carter et al., 2001; Sampson & Bobik, 2008; Winter et al., 2010; Winter & Bäumlér, 2011; Yoo et al., 2017).

A



B

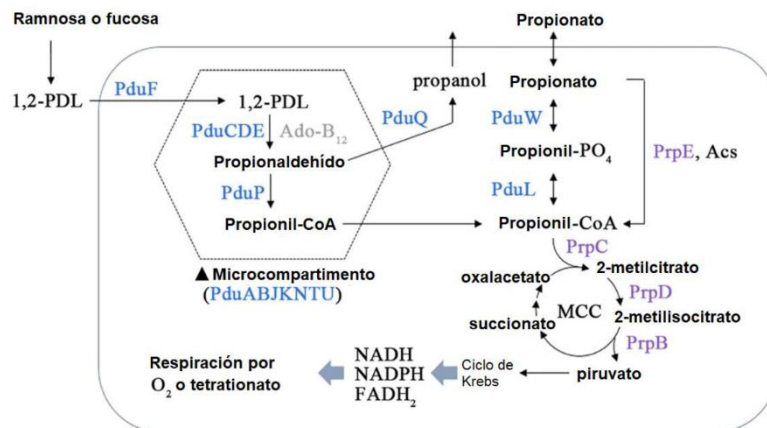


Figura 6. Metabolismo del propanediol (PDL). (A) Representación esquemática de los genes presentes en el operón *pdu* y sus funciones descritas (Modificado de Sturms et al., 2015). (B) Metabolismo del PDL: las enzimas codificadas por el operón *pdu* se encuentran indicadas en azul. El PDL es convertido en propionil-CoA dentro de estructuras denominadas microcompartimentos. El catabolismo del propionato se lleva a cabo por las enzimas codificadas en el operón *prp*, indicadas en morado. El intermediario entre las dos vías (propionil-CoA), se convierte en piruvato a través de la vía del 2-metilcitrate (MCC), incorporándose así al ciclo de Krebs, a través de la respiración aeróbica (oxígeno) o anaeróbica (tetrationato) (Modificado de Yoo et al., 2017).

Para la degradación de PDL se requiere el cofactor 5'-desoxiadenosilcobalamina (Ado-B₁₂, cuyo precursor es la vitamina B₁₂) (Roth et al., 1996). *Salmonella* sintetiza el cofactor B₁₂ con las enzimas codificadas en el operón *cbi-cob*, el cual se encuentra de manera contigua al operón *pdu* (Figura 7) (Bobik et al., 1999; Rondon & Escalante-Semerena, 1992; Roth et al., 1993). Específicamente, el cofactor Ado-B₁₂, se necesita para la actividad de la enzima propanediol deshidratasa (Bobik et al., 1999).

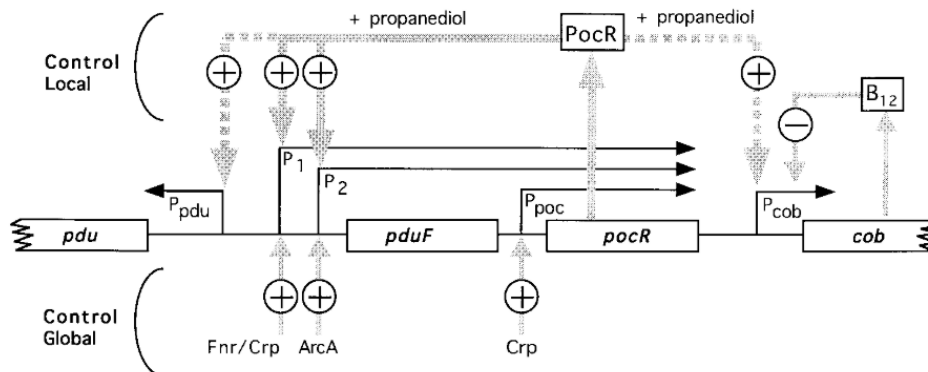


Figura 7. Regulación de los operones *pdu* y *cbi-cob* en *S. Typhimurium*. Véase el texto para más detalles. (Modificado de Roth et al., 1996).

Los operones *pdu* y *cbi-cob* se transcriben de manera divergente y su expresión se activa por el regulador transcripcional *PocR* en presencia de propanediol, a través de los promotores P_{pdu} y P_{cob} , respectivamente (Figura 7) (Bobik et al., 1992; Rondon & Escalante-Semerena, 1992). La expresión de *pocR* está regulada a través de tres promotores; el promotor P_{poc} mantiene los niveles basales de *PocR*, mientras que, en presencia de propanediol, *PocR* activa la transcripción de *pduF* a partir de los promotores P_1 y P_2 , cuyos transcritos se pueden extender hasta incluir al gen *pocR* (Figura 7) (Ailion et al., 1993; Chen et al., 1994, 1995; Roth et al., 1996). Los reguladores transcripcionales CRP/Fnr y *ArcA* activan la transcripción de *pduF/pocR* a partir de los promotores P_1 y P_2 , respectivamente. En presencia de bajos nutrientes, CRP activa la expresión de *PocR* a través del promotor P_{poc} , mientras que, en un ambiente anaeróbico también actúan los reguladores *Fnr* o *ArcA* para activar su expresión a través de los promotores P_1 y P_2 (Ailion et al., 1993; Chen et al., 1995; Roth et al., 1996). Asimismo, la proteína IHF se requiere para activar la expresión de los genes *pdu* y del regulador *PocR* (Rondon & Escalante-Semerena, 1997). Por otra parte, la enzima $EIIA^{Ntr}$ del sistema PTS de nitrógeno activa la expresión del operón *pdu* mediante el incremento de la síntesis del glutatión; CRP también induce la

expresión de los genes *pdu* al incrementar los niveles de EIIA^{Ntr} en respuesta a la disponibilidad de glucosa (Rondon et al., 1995; Yoo et al., 2017, 2021). Además, la proteína Fis asociada al nucleóide regula negativamente la expresión de los genes *pdu* y *cbi-cob* (Kelly et al., 2004).

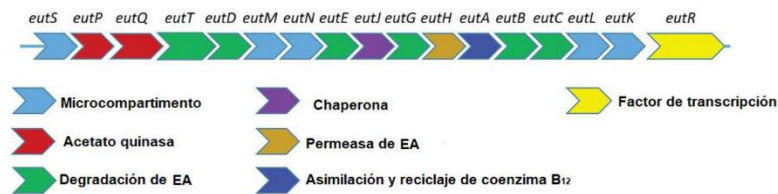
Para la expresión de PdcR y por ende de los operones *pdu* y *cbi-cob* se han propuesto tres estados de activación (Chen et al., 1995). Primero, el estado apagado, en el cual existe una expresión basal de PdcR, es condiciones donde se encuentran disponibles fuentes de carbono preferenciales como la glucosa. Después, un estado en espera, en condiciones de bajos nutrientes, en presencia o ausencia de oxígeno, CRP induce la expresión de PduF y PdcR para detectar y captar el propanediol una vez que se encuentre disponible. Por último, el estado encendido, en condiciones de bajos nutrientes, en presencia o ausencia de oxígeno, en presencia de propanediol; en este estado hay una alta expresión de PdcR que activa la expresión de los operones *pdu* y *cbi-cob* a altos niveles. No obstante, la expresión de *cbi-cob* se activa también en un ambiente anaeróbico a través del sistema de dos componentes ArcB/ArcA (Andersson, 1992; Andersson & Roth, 1989). Además, la presencia de vitamina B₁₂ reprime la expresión del operón *cbi-cob* a través de la formación de una estructura en el RNAm que secuestra la secuencia SD (Richter-Dahlfors & Andersson, 1992; Vitreschak et al., 2003). Esto indica que el metabolismo de propanediol ocurre en un ambiente anaeróbico donde se sintetiza la vitamina B₁₂ de manera endógena, aunque también puede ocurrir en un ambiente aeróbico pero se requiere de una fuente de vitamina B₁₂ exógena (Price-Carter et al., 2001).

2.4.2 Genes *eut*

Se han descrito 17 genes *eut* (“ethanolamine utilization”) involucrados en la utilización de la etanolamina (EA) como fuente de carbono y nitrógeno, los cuales constituyen dos unidades transcripcionales: *eutSPQTD MNEJGHABCLKR* y *eutR* (Figura 8A y 9) (Kofoid et al., 1999; Roof & Roth, 1988, 1989, 1992). La utilización de EA involucra primero su introducción a las bacterias y después varios pasos enzimáticos (Figura 8B); EutH facilita la entrada de EA a las bacterias (Sheppard et al., 2004). Posteriormente, la degradación de la EA comienza con la conversión de la etanolamina a acetaldehído y amonio a través de la enzima etanolamina amonio liasa codificada por los genes *eutBC*. Esta reacción se lleva a cabo en los microcompartimentos formados por las proteínas codificadas en los genes *eutKLMNS*. Posteriormente, el acetaldehído se convierte en etanol o en acetil-CoA por acción de las enzimas alcohol deshidrogenasa (*eutG*) o acetaldehído deshidrogenasa (*eutE*), respectivamente. El etanol puede ser excretado por la célula, mientras que el acetil-CoA se procesa en el citoplasma, donde: 1) puede convertirse en acetil-fosfato por acción de las enzimas fosfotransacetilasa (*eutD*) o fosfato acetiltransferasa (*pta*) y después en acetato por la enzima acetato quinasa (*eutP*, *eutQ* o *ackA*) (Garsin, 2010; Kaval & Garsin, 2018; Moore & Escalante-Semerena, 2016); 2) entrar al ciclo de Krebs, para finalmente generar ATP mediante la

respiración aeróbica (oxígeno) o anaeróbica (tetrationato) (Garsin, 2010; Kaval & Garsin, 2018; Price-Carter et al., 2001; Thiennimitr et al., 2011; Winter et al., 2010).

A



B

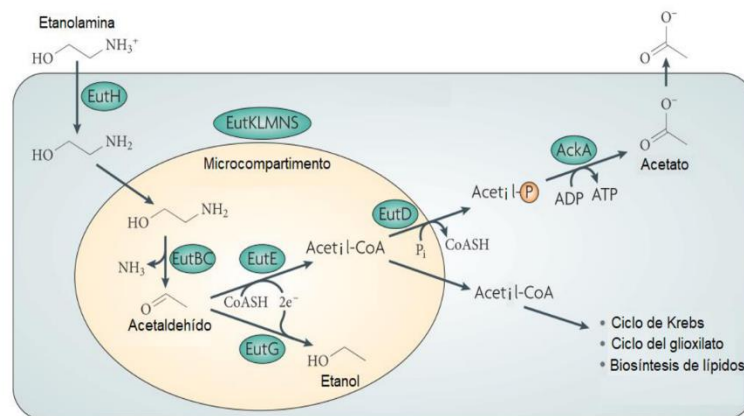


Figura 8. Metabolismo de la etanolamina (EA). (A) Representación esquemática de los genes presentes en el operón *eut* y sus funciones descritas (Modificado de Sturms et al., 2015). (B) Metabolismo de la EA: la EA es degradada a acetaldéhidido y amonio (NH_3). Posteriormente, el acetaldéhidido es metabolizado a etanol o acetil-CoA, el cual puede ser incorporado al ciclo de Krebs o ser convertido en acetil-fosfato y después a acetato y ATP (Modificado de Garsin, 2010).

Para la utilización de la etanolamina (EA) se requiere también el cofactor Ado- B_{12} , el cual activa a la enzima etanolamina amonio liasa (Roof & Roth, 1988, 1989, 1992; Sheppard & Roth, 1994).

El regulador transcripcional EutR activa la expresión del operón *eut* en presencia de EA y de vitamina B_{12} (Roof & Roth, 1992; Sheppard & Roth, 1994). La expresión de *eutR* se activa a través de dos promotores, P1 y P2 (Figura 9) (Garsin, 2010; Kaval & Garsin, 2018; Kofoid et al., 1999; Roof & Roth, 1989, 1992). P2, localizado corriente arriba de *eutR*, es un promotor débil que expresa a *eutR* de manera constitutiva; sin embargo, en presencia de EA y vitamina B_{12} , EutR induce la expresión máxima del operón *eut* y de su propia expresión a partir del promotor P1, localizado corriente arriba de *eutS*. La enzima etanolamina amonio liasa y el regulador EutR compiten por el cofactor B_{12} , lo que controla los niveles de expresión del operón *eut* (Sheppard & Roth, 1994). Además, los reguladores Fis y CRP también controlan positivamente la expresión del operón *eut*; CRP en ausencia de glucosa (Kelly et al., 2004; Roof & Roth, 1992).

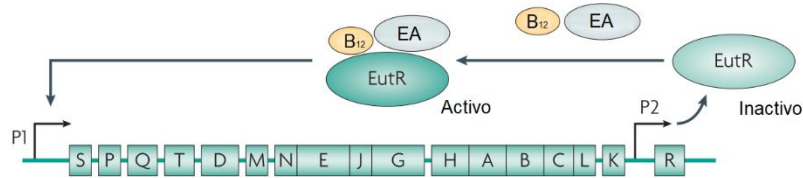


Figura 9. Regulación del operón *eut*. EutR se expresa a bajos niveles a partir del promotor P2. El regulador EutR cambia al estado activo en presencia de etanolamina (EA) y de B₁₂, induciendo la expresión del operón *eut* a partir del promotor P1 (Modificado de Garsin, 2010).

2.4.3 Reguladores transcripcionales PocR y EutR

Los reguladores transcripcionales PocR y EutR son miembros de la familia AraC/XylS (Roth et al., 1996). Estos reguladores contienen en el C-terminal un dominio hélice-vuelta-hélice de unión al DNA altamente conservado entre los miembros de esta familia, mientras que el dominio N-terminal se encuentra menos conservado y, en algunos casos, se ha demostrado que unen moléculas (Gallegos et al., 1997; Schleif, 2010). Aunque no se ha confirmado que PocR y EutR reconozcan señales, en el N-terminal de PocR se encontró un probable dominio de unión a PDL (Anantharaman & Aravind, 2005), lo cual concuerda con que la unión de PocR al DNA se regula positivamente por PDL (Rondon & Escalante-Semerena, 1996). Por otra parte, se sugiere que la unión de la EA y vitamina B₁₂ induce el estado activo de EutR (Garsin, 2010; Luzader et al., 2013; Roof & Roth, 1992).

El regulador PocR activa directamente la expresión de *cbi-cob* al unirse en dos sitios sobre la región promotora de *cbiA* (el primer gen del operón *cbi-cob*), específicamente en las secuencias TGAATAGCAATATTTTGCTATT (22 pb) y CTGGTGTAACAATAAATTGTCATAGCGCAACAAAATAATAAAATTTAG (48 pb), que se encuentran entre las posiciones -601 a -578 y -526 a -478, respectivamente, con respecto al ATG de *cbiA* (Rondon & Escalante-Semerena, 1996). Sin embargo, estas secuencias no se encuentran conservadas en la región promotora de *pduA* o de *pduF*, y no se ha confirmado la unión de PocR a estos dos genes. A pesar de que algunos autores indican que el operón *cbi-cob* no se induce en presencia de EA (Bobik et al., 1992; Rondon & Escalante-Semerena, 1992), se ha descrito un posible sitio de unión del regulador EutR sobre la región promotora de *cbiA*; la secuencia TATTGCCGATTTTTGAT (17 pb) que se encuentra entre las posiciones -582 a -565 pb con respecto al ATG de *cbiA* (Tsoy et al., 2009). Esto sugiere que el operón *cbi-cob* se regula por ambos reguladores PocR y EutR. Por otra parte, en *E. coli* se encontró que EutR se une a la región promotora de *eutS* (el primer gen del operón *eut*), en la secuencia CTTGCCGAATTTTGTTATTTACT (23 pb) que se encuentra entre las posiciones -73 a -50 pb con respecto al ATG de *eutS*; esta secuencia se encuentra conservada en el gen *eutS* de *S. Typhimurium* (Anderson et al., 2015; Luzader et al., 2013; Tsoy et al., 2009).

Adicionalmente, se ha reportado que PocR reprime la expresión del operón *eut* para evitar una mezcla perjudicial de las proteínas estructurales de los microcompartimentos

para PDL y EA (Sturms et al., 2015), aunque esto podría depender de las concentraciones de estos compuestos (Jakobson et al., 2015). Esto indica que no se metaboliza al mismo tiempo el PDL y la EA, lo que sugiere un control estricto en la regulación de los operones *pdu* y *eut*.

2.5 Sistemas de regulación BarA/SirA y Csr

Entre los diversos reguladores globales que controlan la expresión de los genes de SPI-1 se encuentra el sistema de dos componentes (TCS) BarA/SirA y el sistema Csr (Figura 3 y 10) (Hung et al., 2019; Martínez et al., 2011). Los sistemas BarA/SirA y Csr están presentes en diversas bacterias, donde controlan la expresión de genes con diferentes funciones celulares, como la virulencia, el metabolismo del carbono, la respuesta a estrés, la movilidad, la formación de biopelículas y la percepción del quórum (Pourciau et al., 2020; Vakulskas et al., 2015).

El TCS BarA/SirA consta de la proteína cinasa sensora BarA y el regulador de respuesta SirA. En presencia de los ácidos grasos de cadena corta, acetato y formato (Alvarez et al., 2021; Chavez et al., 2010; Lawhon et al., 2002), BarA se autofosforila y, de esta manera, es capaz de transferir el grupo fosforilo al regulador de respuesta SirA, el cual induce la expresión de los RNA pequeños CsrB y CsrC (CsrB/C) que se unen a la proteína CsrA (Martínez et al., 2014; Vakulskas et al., 2015). CsrA se une a RNA mensajero (RNAm), en secuencias que contienen motivos GGA conservados que se encuentran localizados principalmente dentro de estructuras tipo tallo-asa (Dubey et al., 2005; Mercante et al., 2009). Los RNA pequeños CsrB y CsrC tienen 18 y 9 sitios de unión a CsrA, respectivamente; así, al expresarse, capturan a CsrA, liberando el efecto de CsrA sobre sus múltiples transcritos blanco (Liu et al., 1997; Pourciau et al., 2020; Weilbacher et al., 2003). El mecanismo de regulación más común de CsrA involucra la unión a sitios en la región 5' no traducida de los RNAm, uno de las cuales se superpone a la secuencia Shine-Dalgarno (SD), llevando a la represión de la traducción y a la degradación de los RNAm (Baker et al., 2002; Irie et al., 2010; Pannuri et al., 2012; Romeo et al., 1993; Sabnis et al., 1995; Yakhnin et al., 2011). Sin embargo, CsrA también puede favorecer la expresión de algunos genes mediante la unión a la secuencia 5' no traducida en los RNAm, previniendo la formación de estructuras tallo-asa que secuestran la secuencia SD, o mediante la protección de los RNAm del ataque por RNAsas, lo que favorece la estabilidad de los transcritos (Renda et al., 2020; Yakhnin et al., 2013). Debido a que SirA induce la expresión de CsrB y CsrC, los sistemas BarA/SirA y CsrB/C forman una cascada de regulación que actúa en una gran variedad de genes cuya expresión es directamente controlada por CsrA a nivel postranscripcional (Figura 10).

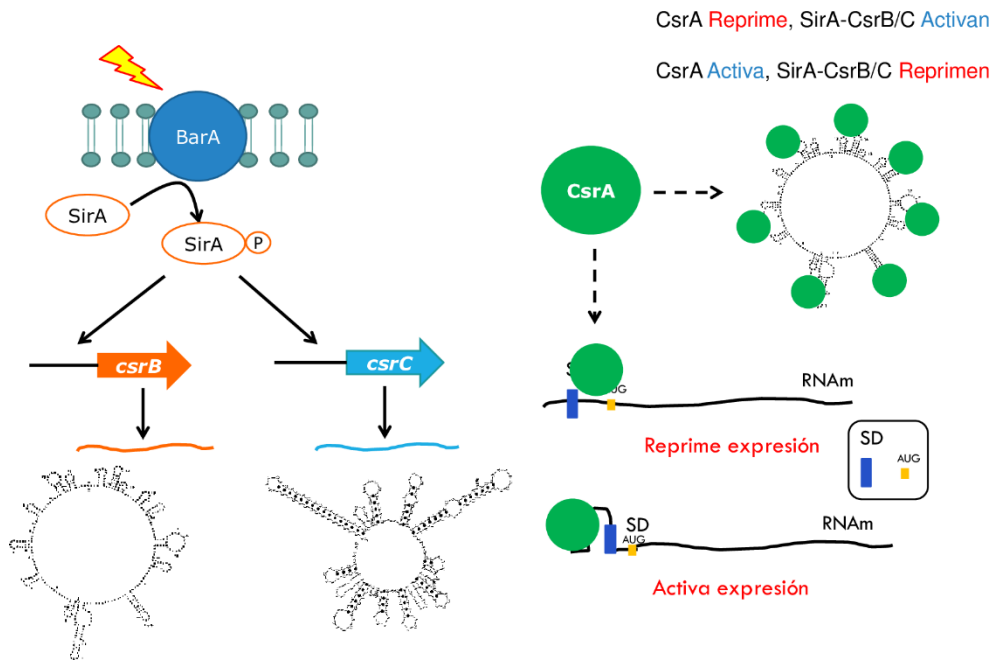


Figura 10. Mecanismo de regulación de los sistemas BarA/SirA y Csr. El sistema de dos componentes BarA/SirA: la cinasa sensora BarA al detectar ácidos grasos de cadena corta se autofosforila y transfiere su grupo fosforilo al regulador de respuesta SirA (SirA-P). Entonces, SirA-P activa la expresión de los RNA pequeños CsrB y CsrC, los cuales contienen estructuras tipo tallo-asa que permiten la unión a la proteína de unión a RNA, CsrA. Por su parte, CsrA es un regulador postranscripcional que reprime la expresión de algunos de sus genes blanco al unirse sobre la secuencia SD o sobre el codón de inicio, evitando así la traducción de los RNAm; asimismo, es capaz de activar la expresión de algunos de sus genes blanco al prevenir la formación de una estructura en el RNAm que impide la traducción o que favorece su degradación. Por lo tanto, si CsrA reprime la expresión de algunos genes, SirA-CsrB/C los activa y viceversa.

3. ANTECEDENTES

Un estudio previo de nuestro grupo demostró que los sistemas BarA/SirA y Csr regulan positivamente la expresión de HilD, el regulador de los genes de SPI-1 (Martínez et al., 2011). La proteína CsrA se une sobre la secuencia SD y el codón de inicio del RNAm de *hilD*, impidiendo así su traducción. BarA/SirA induce la expresión de los RNA pequeños CsrB y CsrC, los cuales antagonizan la actividad de CsrA, permitiendo de esta manera la expresión de HilD.

Por otro lado, recientemente en nuestro grupo realizamos algunos análisis proteómicos para determinar el efecto de la ausencia de SirA o de CsrB/C en la expresión genética global en *S. Typhimurium* (Nava-Galeana et al., 2023a). De manera interesante, estos análisis revelaron que BarA/SirA y CsrB/C controlan de manera opuesta la expresión de genes necesarios para la invasión del epitelio y para la replicación de *Salmonella* en el lumen intestinal; la ausencia de SirA o CsrB/C disminuyó la expresión de SPI-1 e incrementó la expresión de los genes *pdu*, *pocR* y *cbi-cob* (Figura 11A). Además, experimentos de Western blot mostraron que la sobre-expresión de CsrA disminuye la expresión de InvF (SPI-1) e incrementa la expresión de PduP (codificado en el operón *pdu*) (Figura 11B). Asimismo, experimentos transcriptómicos evaluados en la ausencia de CsrA apoyan que CsrA regula inversamente la expresión de los genes de SPI-1 y de los genes *pdu*, *pocR*, *cbi-cob*, *eut* y *eutR* (Lawhon et al., 2003; Potts et al., 2019).

En conjunto, estos datos sugieren que los sistemas BarA/SirA y Csr regulan la expresión de los genes necesarios para la replicación en el lumen intestinal mediante el metabolismo del PDL y la EA (Figura 11C). En este proyecto nos planteamos definir el mecanismo por el cual los sistemas BarA/SirA y Csr controlan la expresión de los genes *pdu* y *eut* en *S. Typhimurium*.

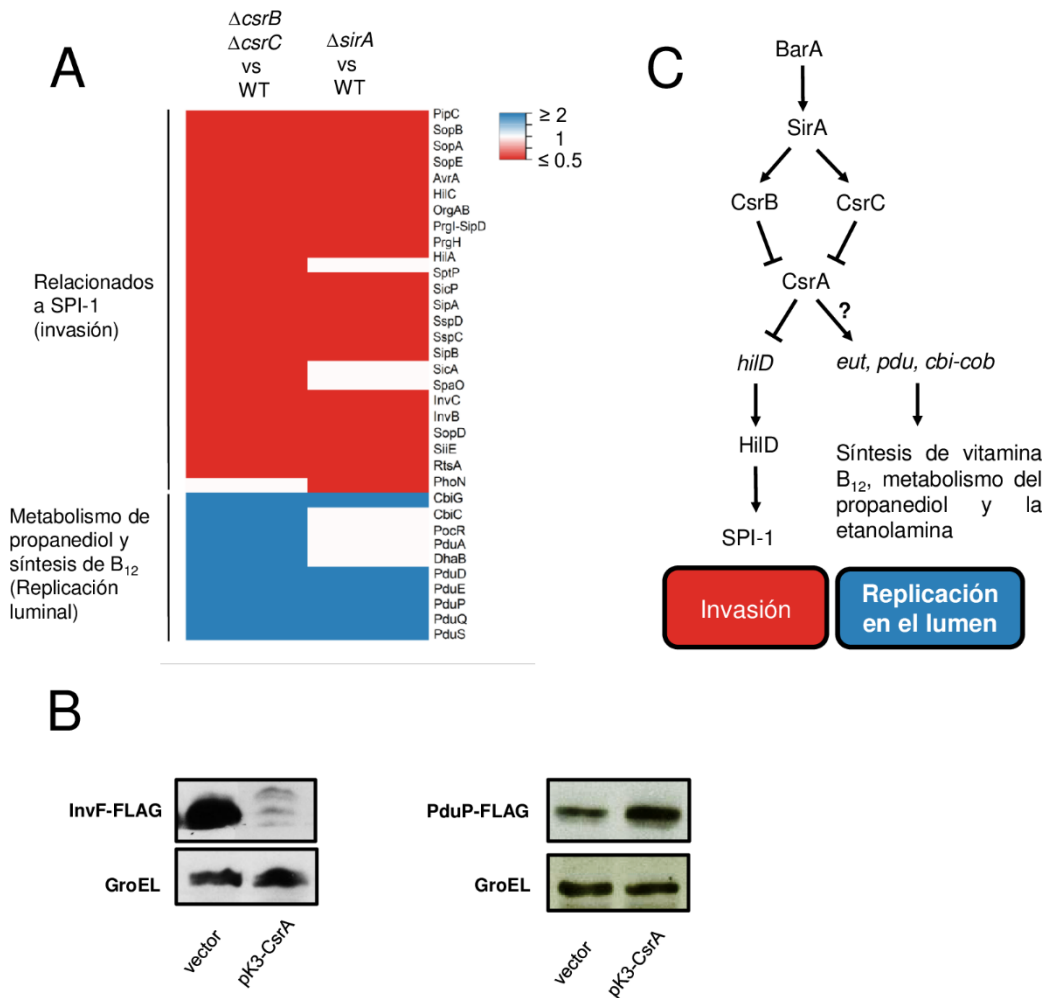


Figura 11. Los sistemas BarA/SirA y Csr regulan de manera opuesta la expresión de los genes de SPI-1 y los genes requeridos para la replicación en el lumen intestinal. (A) Mapa de calor de la expresión de las proteínas de SPI-1 y de los operones *pdu* y *cbi-cob* evaluadas en las cepas mutantes de *S. Typhimurium* $\Delta csrB$ $\Delta csrC$ y $\Delta sirA$, con respecto a la cepa WT. Los valores negativos se observan en rojo (represión) y los positivos en azul (activación) (Modificado de Nava-Galeana et al., 2023a). **(B)** La expresión de InvF-FLAG y PduP-FLAG se analizó mediante Western blot usando el anticuerpo monoclonal anti-FLAG, en la cepa WT con los plásmidos indicados. Como control de carga, se analizó la expresión de GroEL, usando el anticuerpo policlonal anti-GroEL. Los ensayos de Western blot se determinaron a partir de muestras de cultivos crecidos en medio LB durante toda la noche (16 h). **(C)** Modelo de la regulación opuesta de los sistemas BarA/SirA y Csr sobre los genes *eut/pdu/cbi-cob* y *hilD* (SPI-1).

4. HIPÓTESIS

Los sistemas BarA/SirA y Csr controlan la expresión de los operones *pdu* y *eut* a través de los reguladores PocR y EutR.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Determinar el papel de los sistemas de regulación BarA/SirA y Csr en la expresión de los genes *pdu* y *eut* implicados en la replicación luminal de *Salmonella* Typhimurium

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de SirA, CsrB/C y CsrA en la expresión de los genes *pdu* y *eut* en diferentes condiciones de crecimiento.
2. Definir si SirA, CsrB/C y CsrA controlan la expresión de los reguladores de los genes *pdu* y *eut*, PocR o EutR.
3. Determinar si CsrA regula directamente la expresión de los genes *pdu* y *eut*.
4. Evaluar si los genes *pdu* y *eut* se expresan de manera biestable.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas, plásmidos, oligonucleótidos y antibióticos usados en este estudio se enlistan en las tablas 1, 2 y 3.

Tabla 1. Cepas bacterianas usadas en este estudio

Cepa	Descripción	Referencia o fuente
S. Typhimurium		
WT	Cepa WT SL1344; <i>xyl</i> , <i>hisG</i> , <i>rpsL</i> ; Stp ^R	(Hoiseth & Stocker, 1981)
$\Delta sirA$	Derivada de $\Delta sirA$; Stp ^R	(Martínez et al., 2011)
$\Delta csrB \Delta csrC$	Derivada de $\Delta csrB \Delta csrC::Km$; Stp ^R	(Pérez-Morales et al., 2021)
$\Delta pocR::Km$	Derivada de SL1344; Stp ^R , Km ^R	(Nava-Galeana et al., 2023b)
$\Delta pocR$	Derivada de $\Delta pocR$; Stp ^R	(Nava-Galeana et al., 2023b)
$\Delta eutR::Km$	Derivada de SL1344; Stp ^R , Km ^R	(Nava-Galeana et al., 2023b)
$\Delta eutR$	Derivada de $\Delta eutR$; Stp ^R	(Nava-Galeana et al., 2023b)
$\Delta sirA \Delta pocR::Km$	Derivada de $\Delta sirA$; Stp ^R , Km ^R	(Nava-Galeana et al., 2023b)
$\Delta csrB \Delta csrB$ $\Delta pocR::Km$	Derivada de $\Delta csrB \Delta csrB$; Stp ^R , Km ^R	(Nava-Galeana et al., 2023b)
$\Delta sirA \Delta eutR::Km$	Derivada de $\Delta sirA$; Stp ^R , Km ^R	(Nava-Galeana et al., 2023b)
$\Delta csrB \Delta csrB$ $\Delta eutR::Km$	Derivada de $\Delta csrB \Delta csrB$; Stp ^R , Km ^R	(Nava-Galeana et al., 2023b)
$pocR::3XFLAG-Km$	Derivada de SL1344; expresa la proteína PocR-FLAG; Stp ^R , Km ^R	(Nava-Galeana et al., 2023b)
$pocR::3XFLAG$	Derivada de $pocR::3XFLAG-Km$; expresa la proteína PocR-FLAG; Stp ^R	(Nava-Galeana et al., 2023b)
$eutR::3XFLAG-Km$	Derivada de SL1344; expresa la proteína EutR-FLAG; Stp ^R , Km ^R	(Nava-Galeana et al., 2023b)
$eutR::3XFLAG$	Derivada de $eutR::3XFLAG-Km$; expresa la proteína EutR-FLAG; Stp ^R	(Nava-Galeana et al., 2023b)
E. coli		
DH10 β	Cepa de laboratorio, Stp ^R	Invitrogen
BL21/DE3	Cepa para la expresión de proteínas recombinantes	Invitrogen

Tabla 2. Plásmidos usados en este estudio

Plásmidos	Descripción	Referencia o fuente
pKD4	Derivado de pANTSY; contiene el gen de resistencia a Km, flanqueado por FRT's; Km ^R	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD46	Derivado de pINT-ts, contiene el sistema de recombinación del fago λRojo bajo el promotor inducible por arabinosa; sensible a una temperatura mayor a 30°C; Amp ^R	(Datsenko & Wanner, 2000)
pCP20	Vector de replicación termosensible e inducción térmica de la síntesis de la recombinasa FLP; Amp ^R	(Datsenko & Wanner, 2000)
pSUB11	Vector templado para el etiquetado de genes con la secuencia que codifica el epítipo 3XFLAG; contiene además el gen de resistencia a Km, flanqueado por FRT's; Km ^R	(Uzzau et al., 2001)
pRS414	Vector derivado de pRS415 y pMC1403 para construir fusiones traduccionales a <i>lacZ</i> ; Amp ^R	(Simons et al., 1987)
ppduA-lacZ	Plásmido derivado de pRS414 que contiene la fusión traduccional <i>pduA'</i> - <i>lacZ</i> desde los nucleótidos -618 a +38	(Nava-Galeana et al., 2023a)
ppocR-lacZ	Plásmido derivado de pRS414 que contiene la fusión traduccional <i>pocR'</i> - <i>lacZ</i> desde los nucleótidos -252 a +68	(Nava-Galeana et al., 2023b)
peutS-lacZ	Plásmido derivado de pRS414 que contiene la fusión traduccional <i>eutS'</i> - <i>lacZ</i> desde los nucleótidos -589 a +89	(Nava-Galeana et al., 2023b)
peutR-lacZ	Plásmido derivado de pRS414 que contiene la fusión traduccional P2- <i>eutR'</i> - <i>lacZ</i> desde los nucleótidos -454 a +104	(Nava-Galeana et al., 2023b)
pMPM-K3	Vector de clonación de bajo número de copias derivado de p15A, contiene el promotor <i>lac</i> ; Km ^R	Mayer, 1995
pK3-CsrA	Plásmido derivado de pMPM-K3, expresa a CsrA bajo el promotor <i>lac</i>	(Martínez et al., 2011)
pK3-CsrB	Plásmido derivado de pMPM-K3, expresa a CsrB bajo el promotor <i>lac</i>	(Martínez et al., 2011)

pMAL-c2X	Vector de expresión para la construcción de proteínas recombinantes fusiones a la proteína de unión a maltosa (MBP), promotor <i>lac</i> ; Amp ^R	New England Biolabs
pMAL-PocR	Plásmido derivado del pMAL-c2X que expresa la proteína de fusión MBP-PocR; Amp ^R	(Nava-Galeana et al., 2023b)
pFPV25.1	Vector con origen ColE1 (pBR322) que expresa constitutivamente la expresión del gen reportero <i>gfpmut3</i> bajo el promotor de <i>rpsM</i> .	(Valdivia & Falkow, 1996)
pUA66	Vector con origen sc101 que contiene al gen reportero <i>gfpmut2</i> sin promotor; Km ^R	(Zaslaver et al., 2006)
ppduA-gfp	Plásmido derivado de pUA66 que contiene la fusión transcripcional <i>pduA-gfp</i> desde los nucleótidos -618 a +38	Este estudio
peutS-gfp	Plásmido derivado de pUA66 que contiene la fusión transcripcional <i>eutS-gfp</i> desde los nucleótidos -589 a +89	Este estudio

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

Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este estudio

Nombre	Secuencia (5'-3') ^{1,2}	ER ²
Construcción de la cepa <i>pocR::3XFLAG</i>		
PocR-FLAGFw	TAT CGC CAG CAG ATA AAT GAG AAT TCT CAT CCT CCA TCG TTA <u>GAC TAC AAA GAC CAT GAC GG</u>	
PocR-FLAGRv	ACA AAA GAC TAT CAA AAA TCG GCA ATA GCA AAA TAT TGC TAT <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u>	
Construcción de la cepa mutante Δ<i>pocR::Km</i>		
pocR-H1P1	TAA ATT AAC TGA GGG GTT TTA TCA TGA TTT CTG CGA GCG CTC <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u>	
PocR-FLAGRv	ACA AAA GAC TAT CAA AAA TCG GCA ATA GCA AAA TAT TGC TAT <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u>	
Caracterización de la cepa Δ<i>pocR::Km</i> y <i>pocR::3XFLAG</i>		
pocR-FwEcoRI	CTT GAA TTC GGT AAG AAT TTA CCT TGT AAC C	EcoRI
pocR-R	CCT GAC ACT GTA CTT CAT CAC	
Construcción de la cepa <i>eutR::3XFLAG</i>		

eutR-FLAGFw	AAA CCG TCG TTG ACG CTG CAT CAA CGG ATG CGG CAA TGG GCT <u>GAC TAC AAA GAC CAT GAC GG</u>	
eutR-FLAGRv	CAC GCG CAC GTT ATC AGC AAC CGG AGA GCC TCC CCA TCA ATA <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u>	
Construcción de la cepa mutante ΔeutR::Km		
eutR-H1P1	GCA TAG AAG ATC ATG AAA AAG ACC CGT ACA GCG AAT TTG CAC <u>TGT AGG CTG GAG CTG CTT CG</u>	
eutR-FLAGRv	CAC GCG CAC GTT ATC AGC AAC CGG AGA GCC TCC CCA TCA ATA <u>CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG</u>	
Caracterización de la cepa ΔeutR::Km y eutR::3XFLAG		
eutR-FwEcoRI	CTT GAA TTC GAA CAA CTC TTT TCT GAC GGA G	EcoRI
eutR-R	CAG ACA GCA GCG AAT CCG TAG	
Caracterización de las mutantes y etiquetas con el epítoto 3XFLAG (con casete de Km^R)		
K1	CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT	
K2	CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC	
Construcción de la fusión pduA'-lacZ		
pduA-FwEcoRI	CTT GAA TTC CTT TGA GCG CGC TCA AAC AAC	EcoRI
R2pduA-BamHI	CTT GGA TCC CCT TTG GTT TCT ACC ATT CCT AG	BamHI
Construcción de la fusión pocR'-lacZ		
pocR-FwEcoRI	CTT GAA TTC GGT AAG AAT TTA CCT TGT AAC C	EcoRI
pocR-RvBamHI	CTT GGA TCC GTG GCT TGT GCA AAA TCC TG	BamHI
Construcción de la fusión eutS'-lacZ		
eutS-FwEcoRI	CTT GAA TTC GAA CAC GGC GAA GAT ACA GG	EcoRI
R2eutS-BamHI	CTT GGA TCC GCC AGT TCT TCA CCA GGG TG	BamHI
Construcción de la fusión P2-eutR'-lacZ		
F2eutR-EcoRI	CTT GAA TTC GTT TGC TCA GTC ATC AAG TGC	EcoRI
R2eutR-BamHI	CTT GGA TCC CGC TGA TGA ACA TTG TCC ACC	BamHI
Caracterización de construcciones en el pRS414		
lacZ-rev11	GGC GAT TAA GTT GGG TAA CGC	
Construcción del plásmido pMAL-PocR		
F2PocR-MBP	CTT GGA TCC ATT TCT GCG AGC GCT CTG AAC TC	BamHI
R2PocRMBP	CTT CTG CAG GAC TAT CAA AAA TCG GCA ATA GC	PstI
Caracterización de construcciones en el pMAL-c2X		
pMAL-Fw (MBP)	GAT GAA GCC CTG AAA GAC GCG CAG	
Construcción de la fusión pduA-gfp		
pduA-FwXhoI	CTT CTC GAG CTT TGA GCG CGC TCA AAC AAC	XhoI
R2pduA-BamHI	CTT GGA TCC CCT TTG GTT TCT ACC ATT CCT AG	BamHI

Construcción de la fusión <i>eutS-gfp</i>		
eutS-FwXhoI	CTT <i>CTC GAG</i> GAA CAC GGC GAA GAT ACA GG	XhoI
R2eutS-BamHI	CTT <i>GGA TCC</i> GCC AGT TCT TCA CCA GGG TG	BamHI
Caracterización de construcciones en el pUA66		
gfp-rev32	CTC TCC ACT GAC AGA AAA TTT G	
Para ensayos de retardo (RNA)		
T7P pduA For	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG TTC TTA TAG TCC CAA CTA TCG GAA CAC TCC	
pduA Rev	CCT TTG GTT TCT ACC ATT CCT AGT GCT TC	
T7P pocR For	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG ACT TTT TAT CAG GGC CAG GAT AAT GG	
pocR Rev	CAT GAT AAA ACC CCT CAG TTA ATT TAT TGT TAT AAA C	
T7P eutS For	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG ACA AAA AAT TGC CAC GAT GAC GGC AG	
eutS Rev	GAC CTG TTT GCC CGG CAC AAA TTC CTG AAT AAT G	

Nota: ¹ La secuencia que corresponde al plásmido templado pKD4 o pSUB11 se muestra subrayada. ² ER: Enzima de restricción; en letras cursivas se muestra el sitio de corte en enzimas de restricción creado dentro del oligonucleótido.

6.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se listan en la tabla 1. Los cultivos bacterianos se crecieron en medio líquido LB-Miller (LB) que contiene 1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura y 1% de NaCl, a pH 7.4. Los medios se suplementaron con los antibióticos: estreptomycin (Stp) a 100 µg/mL, ampicilina (Amp) a 200 µg/mL o kanamicina (Km) a 30 µg/mL. Los pre-inóculos se crecieron durante toda la noche (16 h) en tubos con 5 mL de LB. Posteriormente, los tubos con 5 mL de LB se inocularon con 50 µL del pre-inóculo y se incubaron durante toda la noche (16 h) en LB a 37°C en agitación a 200 rpm.

6.2 Construcción de cepas mutantes y cepas que expresan proteínas etiquetadas con el epítipo 3XFLAG

La construcción de las cepas mutantes se basa en la metodología de mutagénesis (Datsenko & Wanner, 2000). La estrategia general se basó en reemplazar a los genes *pocR* y *eutR* 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. En este procedimiento, la recombinación requiere la recombinasa del fago λ Rojo, la cual se sintetiza bajo el control de un promotor inducible por arabinosa en un plásmido de bajo número de copias (pKD46) (Tabla 2). Para etiquetar a las proteínas PocR y EutR con el epítipo FLAG (3XFLAG), se empleó una modificación del sistema del fago λ Rojo para la mutagénesis descrita anteriormente.

Esta modificación consiste en agregar en fase la secuencia que codifica el epítipo 3XFLAG al final del gen cromosomal que se requiere etiquetar, sustituyendo de esta manera el codón de término (Uzzau et al., 2001). Para esto se amplificó por PCR el gen de resistencia a Km a partir del plásmido pKD4 ó pSUB11 para 3XFLAG-Km, empleando los oligonucleótidos que proveen la región homóloga al gen de interés (Tabla 3). Se realizaron 5 reacciones de PCR de 100 μ L y los productos se concentraron en 7 μ L de agua realizando el siguiente protocolo. Se agregó 100 μ L de acetato de amonio 7.5 M pH 7.8, 300 μ L de fenol y 300 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (50:1) a la reacción de PCR; se mezcló invirtiendo los tubos y se centrifugó durante 5 min a 15,000 $\times g$. Después se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó 500 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico. Se mezcló invirtiendo los tubos y se centrifugó durante 5 min a 15,000 $\times g$. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó 800 μ L de etanol absoluto a cada tubo, los cuales se agitaron e incubaron a -70 °C durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, los tubos se centrifugaron durante 30 min a 15,000 $\times g$, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 70%. Después, se centrifugó durante 10 min a 15,000 $\times g$, se desechó el sobrenadante y se secaron los tubos con calor en un “Concentrator Centrifuge SpeedVac SC100” (Savant) durante 10 min. Posteriormente, se resuspendió el DNA en 7 μ L de agua y se corrió 1 μ L de DNA en un gel de agarosa para observar su integridad. Por otra parte, se realizó un pre-inóculo de la cepa *S. Typhimurium* SL1344 WT que contiene el plásmido pKD46 en cajas de LB adicionada con Amp, se incubó toda la noche (16 h) a 30°C. Al día siguiente, se inocularon 30 colonias en 25 mL de SOB suplementado con 25 μ L de Amp y 2.5 mL de L+-arabinosa 1 M y se incubó a 30°C a 200 rpm hasta una OD_{600nm} de 0.6. Estas células se centrifugaron durante 6 min a 5,000 $\times g$ a 4°C, se desechó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla de células en 5 mL de agua fría y se centrifugó a 5,000 $\times g$ a 4°C durante 6 min. Se descartó el sobrenadante y este paso de lavado se repitió 2 veces más para finalmente resuspender la pastilla de células en 100 μ L de agua fría estéril. 50 μ L de estas células electrocompetentes se transformaron por electroporación con 3 μ L de producto de PCR concentrado y, después, se incubaron en 1 mL de medio SOC durante 3 h a 30°C a 200 rpm. Posteriormente se sembraron 300 μ L de células en cajas de LB adicionado con Km y se incubaron a 42°C durante toda la noche (16 h). Las transformantes que se obtuvieron se resembraron en una caja LB adicionado con Km y se incubaron a 42°C con el fin de separar colonias. Finalmente, las colonias se sembraron en medio LB adicionado con Stp, Km o Amp, con el fin de analizar resistencia o sensibilidad a los antibióticos. Para la caracterización de las mutantes resistentes a kanamicina y sensibles a ampicilina, se realizaron distintas reacciones de PCR con varios juegos de oligonucleótidos externos de donde se removió el gen y con los oligonucleótidos K1 y K2 (Tabla 3). De esta manera se generaron las cepas Δ *pocR*::Km, Δ *eutR*::Km, *pocR*::3XFLAG-Km y *eutR*::3XFLAG-Km.

Cuando se requirió, el casete de resistencia a Km que se insertó en las cepas mutantes o etiquetadas, se eliminó empleando el plásmido pCP20 (Tabla 2) que expresa la

recombinasa FLP, la cual reconoce directos repetidos FRT (“FLP recognition targets”) que flanquean el gen de resistencia insertado, con lo que al llevarse a cabo al recombinación entre estos sitios, se pierde el casete de resistencia (Datsenko & Wanner, 2000). De esta manera se generaron las cepas $\Delta pocR$, $\Delta eutR$, $pocR::3XFLAG$ y $eutR::3XFLAG$.

Las cepas doble y triple mutantes $\Delta sirA \Delta pocR::Km$, $\Delta csrB \Delta csrC \Delta pocR::Km$, $\Delta sirA \Delta eutR::Km$ y $\Delta csrB \Delta csrC \Delta eutR::Km$, se generaron al introducir la delección $\Delta pocR::Km$ o $\Delta eutR::Km$ en las cepas $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$ (Tabla 1), mediante transducción con el fago P22.

Todas las cepas mutantes o etiquetadas se verificaron mediante PCR y secuenciación en la unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM

6.3 Construcción de plásmidos

Para construir los plásmidos ppduA-lacZ, ppocR-lacZ, peutS-lacZ y peutR-lacZ (Tabla 2), las regiones reguladoras de *pduA*, *pocR*, *eutR* y *eutS* se amplificaron mediante PCR usando los pares de oligonucleótidos pduA-FwEcoRI/R2pduA-BamHI, pocR-FwEcoRI/pocR-RvBamHI, F2eutR-EcoRI/R2eutR-BamHI y eutS-FwEcoRI/R2eutS-BamHI, respectivamente (Tabla 3). Los productos de PCR se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. Estos productos de PCR digeridos se clonaron en el plásmido pRS414 que contiene el gen *lacZ* sin promotor y que codifica para la enzima β -galactosidasa a partir del noveno codón, el cual se digirió con las mismas enzimas.

Para construir el plásmido pMAL-PocR (Tabla 2) que expresa a las proteína de fusión MBP-PocR, el gen estructural *pocR* se amplificó mediante PCR usando los oligonucleótidos F2PocR-MBP y R2PocR-MBP (Tabla 3). El producto de PCR resultante se digirió con las enzimas de restricción BamHI y PstI y se clonó en el vector pMAL-c2X digerido con las mismas enzimas.

En todos los casos, se utilizó DNA cromosomal de la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 como templado para las reacciones de PCR y una vez construidos los plásmidos se enviaron a la unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM para obtener y verificar su secuencia.

6.4 Preparación de células competentes para electroporación

En la preparación de células electrocompetentes, las cepas de interés se cultivaron en 5 mL de medio LB adicionado con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm durante toda la noche (16 h). Al día siguiente, se utilizó 1 mL de estos cultivos para inocular un matraz de 250 mL que contiene 100 mL de medio SOB adicionado con los mismos antibióticos. Estos cultivos se incubaron a 37°C en agitación hasta una OD_{600nm} de 0.6. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron

durante 6 min a 5,000 x g a 4°C en tubos Falcon de 50 mL estériles, se desechó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 30 mL de agua MQ estéril fría, se mezcló ligeramente y se centrifugó en las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 30 mL de glicerol al 10% frío, se mezcló ligeramente y se centrifugó a 5,000 x g durante 6 min a 4°C. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de células en 500 µL de glicerol al 10% frío.

Para la electroporación, se mezclaron 50 µL de células electrocompetentes y 5 µL del plásmido de interés o 3 µL de reacción de ligación a una celda para electroporar de 0.2 cm (Biorad) y se le dió un pulso eléctrico de 2.5 kV durante 5 ms usando un electroporador MicroPulser (Biorad). Posteriormente, se agregó 1 mL de medio SOC a la celda, se mezcló y se recuperó el volumen en un tubo de ensayo. Estas células se incubaron durante 1 h a 37°C y 200 rpm. Finalmente, se sembraron 100 µL del cultivo en cajas Petri con LB-agar adicionado con los antibióticos correspondientes y se incubaron durante toda la noche (16 h) a 37°C.

6.5 Inmunodetección de proteínas mediante Western blot

Muestras de aproximadamente 1 mL de cultivo de toda la noche (16 h) se centrifugaron durante 2 min a 15,000 x g, se desechó el sobrenadante y la pastilla de bacterias se resuspendió en 250 µL de amortiguador de carga de proteínas 1 X con 0.1 M DTT. Estas muestras se calentaron a 95°C durante 5 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se cargaron 50 µL de este extracto mezclado con 4 µL de marcador preteñido "PAGERuler plus prestained protein ladder" (Thermo Scientific) en geles al 15% de acrilamida, los cuales se corrieron a 30 mA durante 4 h en amortiguador de corrida Tris-Glicina-SDS (25 mM Tris-HCl, 250 mM Glicina y 0.1% SDS). Este gel se utilizó para la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (0.45 µm, Merck Millipore), en una cámara de transferencia semiseca "Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell" (Biorad), usando amortiguador de transferencia (48 mM Tris, 39 mM glicina, 20% metanol, 0.04% SDS) durante 50 min a 15 V. Después de la transferencia, la membrana se incubó con la solución bloqueadora a 4°C en agitación suave durante toda la noche (16 h). Posteriormente, se removió la solución bloqueadora y se hicieron 3 lavados a la membrana con amortiguador PBST durante 15 min en agitación suave. Entonces, se incubó la membrana con el anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma), el anticuerpo monoclonal anti-MBP (Sigma) o con el anticuerpo policlonal anti-GroEL (StressGen), diluidos en PBST a 1:5,000, 1:3,000 o 1:100,000, respectivamente, durante 2-3 h en agitación suave a 4°C. Posteriormente, se retiró el anticuerpo y se hicieron 3 lavados a la membrana con amortiguador PBST durante 15 min en agitación suave. Después, se incubó la membrana con el anticuerpo monoclonal anti-ratón o con el anticuerpo policlonal anti-conejo (Pierce), en una dilución 1:10,000 en ambos casos, durante 1 hora en agitación suave. Entonces, se retiró el anticuerpo y se hicieron 3 lavados a la membrana con amortiguador PBST durante 15 min en agitación suave. Posteriormente, se agregó a la membrana una mezcla 1:1 de reactivo "enhanced

luminol reagent” y del “oxidizing reagent” del kit de revelado “Western Lightening Chemiluminiscense Reagent Plus” (PerkinElmer) y se mantuvieron en agitación durante 1 min. Finalmente, las membranas se expusieron en películas radiográficas “Amersham Imager 600 films” (GE Healthcare).

6.6 Cuantificación de la actividad específica β -galactosidasa

Las muestras de 1.5 mL provenientes de los cultivos bacterianos se centrifugaron durante 3 min a 15,000 $\times g$ y las pastillas obtenidas se resuspendieron en 800 μ L de amortiguador TDTT (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 30 μ M DTT). Las bacterias se lisaron en un sonicador “Vibra Cell”, con pulsos de 10 s y periodos de reposo de 5 s entre cada pulso, durante 6 min. Los restos celulares se separaron por centrifugación durante 15 min a 15,000 $\times g$ y los sobrenadantes se recuperaron en tubos nuevos.

Las proteínas totales solubles se detectaron y cuantificaron mediante un método colorimétrico usando el reactivo ácido bicinonínico (BCA) y sulfato cúprico del kit “Protein Assay Reagent” (Pierce), en microplacas de 96 pozos. Para esto, se agregó 10 μ L de muestra en cada pozo por duplicado. Después, los reactivos se mezclaron en una proporción de 50:1 y se agregó 200 μ L de esta mezcla a cada uno de los pozos de la placa; como blanco, se utilizó 10 μ L de TDTT. La placa se incubó a 37°C durante 30 min. Posteriormente, se calculó la concentración de proteínas totales mediante la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm, en un lector automatizado de microplacas ELx808 (Bio-Tek Instruments Inc.), utilizando el programa Gen5. Los valores de absorbancia se interpolaron en una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) de 0.1 a 1.6 mg/mL, almacenada previamente en dicho programa.

Para determinar la actividad β -galactosidasa, se agregó 20 μ L de cada muestra por duplicado en otra microplaca de 96 pozos, como blanco se utilizó el amortiguador TDTT. Entonces, se agregó 200 μ L de ONPG (0.5 mg/mL en amortiguador Z 1X). La actividad β -galactosidasa se calculó inmediatamente después de añadir el ONPG, utilizando el mismo lector de placas posicionado en modo cinética, donde se tomaron lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 405 nm, cada 15 s durante 5 min de reacción. Los valores de actividad obtenidos de cada muestra se interpolaron en una curva estándar de actividad β -galactosidasa (de 0 a 5400 U) previamente almacenada en el programa Gen5.

Finalmente, la actividad específica β -galactosidasa (U/mg) se obtuvo al restar el valor del blanco y después dividir entre la concentración de proteínas totales para cada muestra.

6.7 Expresión y purificación de la proteína de fusión MBP-PocR

La cepa de *E. coli* BL21/DE3 (Tabla 1) que contiene el plásmido pMAL-PocR (Tabla 2) se creció en dos matraces de 250 mL con 100 mL de medio LB adicionado con 0.2% glucosa, a 37°C en agitación a 200 rpm. Para inducir la expresión de MBP-PocR se

agregó 1 mM de IPTG cuando el cultivo de bacterias alcanzó una OD_{600nm} de 0.6, después se incubó toda la noche (16 h) a 18°C. Posteriormente, las células se colectaron por centrifugación a 5,000 x g durante 10 min a 4°C. La pastilla de células se lavó una vez con 20 mL de amortiguador de columna frío (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA y 10 mM β -mercaptoetanol) y se resuspendió en 30 mL del mismo amortiguador. La suspensión bacteriana se sonicó en un “Soniprep 150 Sonicator” (Sonics and Materials Inc.). Los restos celulares se separaron por centrifugación a 5,000 x g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se pasó a otro tubo. En una columna desechable de 15 mL se empacó 1 mL de resina de amilosa (New England Biolabs), la cual se equilibró con 5 volúmenes de 10 mL de amortiguador de columna frío. El extracto soluble que contenía la proteína fusionada a MBP se adicionó tres veces a la columna de amilosa y se lavó con 13 volúmenes de amortiguador de columna para remover las proteínas unidas inespecíficamente a ella. Finalmente, las proteínas unidas a la resina se eluyeron en 10 mL de amortiguador de columna adicionado con 10 mM de maltosa (Sigma) y se colectaron en 10 fracciones de 1 mL aproximadamente. Estas fracciones se analizaron en un gel de acrilamida al 12% para determinar aquellas que contenían la proteína purificada. Las fracciones seleccionadas se concentraron en 1 mL de amortiguador de diálisis (20 mM Tris-HCl pH 8, 40 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT y 20% glicerol), usando un tubo “Amicon Ultra 50K device” (Merck Millipore) mediante centrifugación a 5,000 x g durante 20 min a 4°C. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford. Las alícuotas de la proteína purificada se almacenaron a -70°C.

6.8 Ensayos de retardo en gel (EMSAs) de DNA

Los fragmentos de DNA que contienen la región reguladora de los genes *pduA*, *pocR*, y *eutR* se obtuvieron por PCR usando los mismos pares de oligonucleótidos utilizados para construir las fusiones traduccionales a *lacZ*. Los productos se purificaron usando el kit “Zymo DNA Clean & Concentrator Kit” (Zymo Research). Aproximadamente 100 ng de cada fragmento de DNA se mezcló con concentraciones crecientes de la proteína purificada MBP-PocR en 20 μ L de amortiguador de unión (10 mM Tris pH 8.0, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 5% glicerol y 10 μ g/mL BSA). Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min, se mezclaron con 2 μ L de amortiguador de carga de DNA 5X [0.25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol FF, 30% glicerol y 50X Gel Red (Biotum)] y después se analizaron en un gel de acrilamida no desnaturante al 6% en amortiguador Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X, a 85V a temperatura ambiente. Después de la corrida, los fragmentos de DNA se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Bio-Rad Molecular Imager, Gel Doc TM, XR+ Imaging System, USA). Los complejos de la proteína MBP-PocR con y sin DNA unido se detectaron mediante Western blot.

6.9 Ensayos de retardo en gel (EMSA) de RNA

Los EMSAs de RNA se realizaron de acuerdo a trabajos reportados previamente (Yakhnin et al., 2011). La proteína CsrA-His (CsrA-H6) de *E. coli*, la cual es idéntica a la de *Salmonella*, se purificó como se ha reportado previamente (Mercante et al., 2006). El RNA se sintetizó *in vitro* usando el kit “RNA Maxx Transcription” (Agilent Technologies). Los fragmentos de PCR empleados como templado para las reacciones de transcripción contienen el promotor T7 y las secuencias de *pocR*, *pduA*, y *eutS* que abarcan las posiciones -91 a +3, -44 a +38 y -47 a +48, respectivamente, con respecto al inicio de la traducción. El RNA purificado se marcó radioactivamente en el extremo 5' con [γ - 32 P]-ATP (7,000 Ci/mmol). El RNA resuspendido en amortiguador TE se calentó a 90°C durante 1 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Las reacciones de unión se realizaron en un volumen final de 10 μ L con 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 200 ng/ μ L RNA de levadura, 0.2 mg/mL BSA, 7.5% glicerol, 20 mM DTT, 0.1 mg/mL xileno cianol FF, 0.2 nM (*eutS* and *pduA*) o 0.1 nM (*pocR*) de RNA y varias concentraciones de CsrA-H6. Los ensayos competitivos también contenían RNA no marcado como competidor específico o no específico. Las mezclas de reacción se incubaron durante 30 min a 37°C para permitir la formación del complejo RNA-CsrA. Las muestras se separaron en geles no desnaturizantes de poliacrilamida al 10% usando amortiguador TBE 0.5X. Las bandas radioactivas se visualizaron con un “phosphorimager” (GE Healthcare) y se cuantificaron usando el programa “ImageQuant 5.2”. Las constantes de disociación aparentes (K_d) de la interacción RNA-CsrA se calcularon como se ha descrito previamente (Yakhnin et al., 2000).

6.10 Análisis por citometría de flujo

Las cepas WT de *S. Typhimurium* que contienen los plásmidos ppduA-gfp o peutS-gfp se crecieron en medio LB hasta una OD_{600nm} de 0.6, entonces se agregó 12.5 mM de 1,2-propanediol (Sigma) y 150 nM de vitamina B₁₂ (Sigma) (para la expresión de *pduA-gfp*), o 10 mM de etanolamina (Sigma) y 150 nM de vitamina B₁₂ (para la expresión de *eut-gfp*). Se tomaron muestras cada 2 h durante 8 h, las cuales se mezclaron en un volumen final de 250 μ L de amortiguador PBS 1X pH 7.4 filtrado con un poro de 0.22 μ m. Las células se fijaron con 250 μ L de paraformaldehído (Sigma) (al 4% en PBS 1X pH 7.4 filtrado) durante 20 min a temperatura ambiente en oscuridad. Las células fijadas se centrifugaron durante 5 min a 15,000 x g. Se desechó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 500 μ L de PBS 1X pH 7.4 filtrado. Posteriormente, se realizó una dilución 1:10 en 500 μ L de PBS 1X pH 7.4 filtrado. La fluorescencia de la proteína GFP se evaluó en el citómetro Cytotflex (Beckman Coulter) con el software CytExpert (Beckman Coulter). Los datos de 10,000 eventos se analizaron con el software FlowJo 10.0.7 (Tree Star, Inc). Las células que contienen el gen reportero *gfp* sin promotor (pUA66), o el que expresa constitutivamente al gen *gfp* (pFPV25.1) se usaron como control negativo y positivo, respectivamente.

6.11 Análisis estadístico

Los resultados de las fusiones traduccionales se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido por la prueba *post-hoc* de Tukey para múltiples comparaciones, mientras que los datos de densitometría se analizaron mediante la prueba *t* de Student no pareada, usando el software GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Los valores de $P < 0.05$ se consideraron como significativos.

7. RESULTADOS

7.1 SirA, CsrB/C y CsrA regulan la expresión de los genes *pdu* y *eut*

Para examinar la regulación de los genes *pdu* y *eut* por SirA, CsrB/C y CsrA, construimos plásmidos con fusiones traduccionales al gen reportero *lacZ*, las cuales contienen la región reguladora corriente arriba y los primeros codones de *pduA* o *eutS* (*pduA* y *eutS* son los primeros genes de los operones *pdu* y *eut*, respectivamente) (Figura 12). Después se analizó la expresión de las fusiones traduccionales generadas *pduA'*-*lacZ* y *eutS'*-*lacZ* en la cepa WT de *S. Typhimurium* SL1344 y sus derivadas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, la cepa WT que sobre-expresa a CsrA a partir del plásmido pK3-CsrA, y en la cepa mutante $\Delta sirA$ que sobre-expresa a SirA o CsrB a partir de los plásmidos pK3-SirA o pK3-CsrB, respectivamente. La cepa $\Delta csrA$ no se analizó debido a que presenta un defecto en el crecimiento (Altier et al., 2000). Las cepas se crecieron en medio LB a 37°C hasta la fase estacionaria, condiciones donde SirA, CsrB/C y CsrA controlan la expresión de los genes de SPI-1 (condiciones inductoras de SPI-1) (Martínez et al., 2011; Sridhar & Steele-Mortimer, 2016). La expresión de las fusiones *pduA'*-*lacZ* y *eutS'*-*lacZ* se incrementó en ambas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, así como en la cepa WT que sobre-expresa a CsrA (Figura 13). Además, la expresión de ambas fusiones disminuyó en la mutante $\Delta sirA$ que sobre-expresa a SirA o CsrB (Figura 13). Estos resultados indican que SirA y CsrB/C controlan negativamente la expresión de los genes *pdu* y *eut*, mientras que CsrA controla positivamente su expresión.

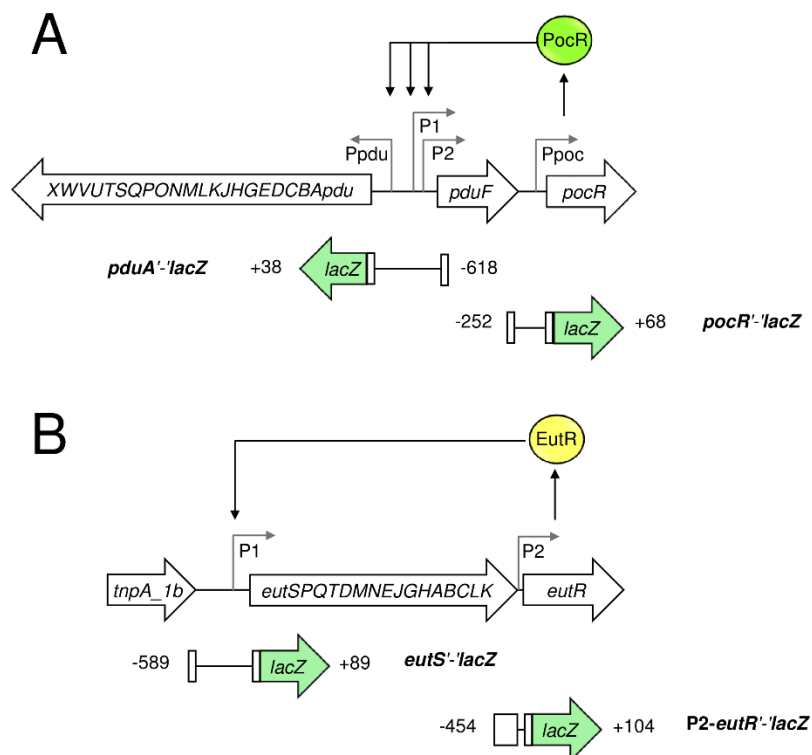


Figura 12. Representación esquemática de los operones *pdu* y *eut*. (A) Los genes *pdu* y *pocR*; *pduA* es el primer gen del operón *pdu*. El regulador transcripcional PocR activa la expresión de los genes *pdu* mediante los promotores localizados corriente arriba de los genes *pduA* y *pduF* (Adaptado de Roth et al., 1996). (B) Los genes *eut*; *eutS* es el primer gen del operón *eut*. El regulador transcripcional EutR activa la expresión de los genes *eut* mediante el promotor localizado corriente arriba del gen *eutS* (Adaptado de Garsin, 2010). Los fragmentos de DNA utilizados en las fusiones *pduA*'-'*lacZ* y *pocR*'-'*lacZ* (A), así como por las fusiones *eutS*'-'*lacZ* y P2-*eutR*'-'*lacZ* (B) se muestran debajo de los esquemas; las posiciones indicadas de las fusiones son relativas al codón de inicio de la traducción. Las figuras no están a escala.

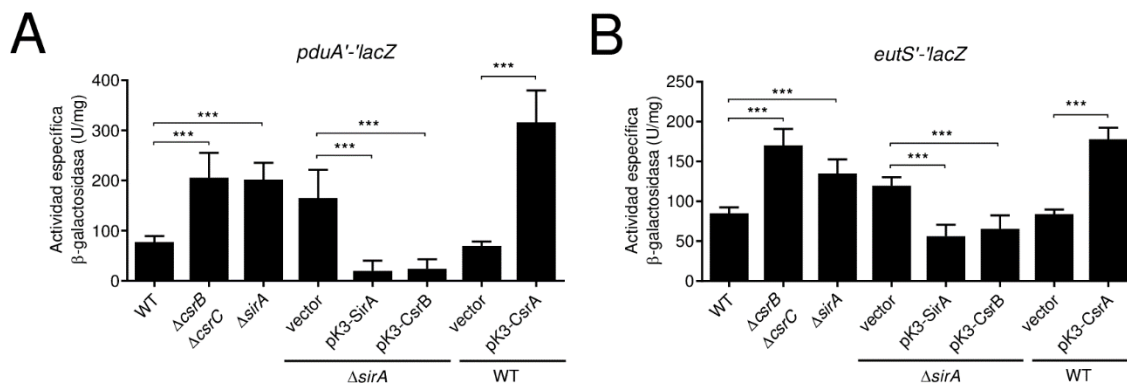


Figura 13. La cascada SirA-CsrB/C-CsrA regula la expresión de los genes *pdu* y *eut*. La expresión de la fusión traduccional *pduA*'-'*lacZ* (A) y *eutS*'-'*lacZ* (B), contenidas en plásmidos, se analizó en las cepas indicadas. La actividad específica β-galactosidasa se determinó a partir de muestras de cultivos crecidos en medio LB durante toda la noche (16 h). Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes hechos por duplicado. ***, representa una diferencia significativa entre las cepas indicadas, con un valor de $p < 0.001$.

7.2 La regulación de los genes *pdu* y *eut* por la cascada SirA-CsrB/C-CsrA requiere la presencia de PocR o EutR

La expresión de los genes *pdu* y *eut* es regulada positivamente por los reguladores transcripcionales PocR y EutR, respectivamente (Bobik et al., 1992; Chen et al., 1995; Garsin, 2010; Roof & Roth, 1992). Por lo tanto, nos preguntamos si la regulación de los genes *pdu* y *eut* por la cascada SirA-CsrB/C-CsrA requiere de PocR o de EutR. Para determinar esto, analizamos la expresión de las fusiones traduccionales *pduA*'-'*lacZ* y *eutS*'-'*lacZ* en las cepas mutantes $\Delta sirA \Delta pocR$, $\Delta csrB \Delta csrC \Delta pocR$, $\Delta sirA \Delta eutR$ y $\Delta csrB \Delta csrC \Delta eutR$, así como en las cepas que sobre-expresan a CsrA en presencia o ausencia de PocR o EutR. El incremento en la expresión *pduA*'-'*lacZ* y *eutS*'-'*lacZ* causada por la ausencia de SirA o CsrB/C o por la sobre-expresión de CsrA (Figura 13), se perdió en la ausencia del regulador PocR o EutR, respectivamente (Figura 14); de hecho, la expresión de *pduA*'-'*lacZ* y *eutS*'-'*lacZ* es apenas detectable en la ausencia de los reguladores PocR o EutR, respectivamente (Figura 14). Estos resultados demuestran que la regulación de los genes *pdu* y *eut* por la cascada de regulación SirA-CsrB/C-CsrA requiere la presencia de PocR y EutR, respectivamente.

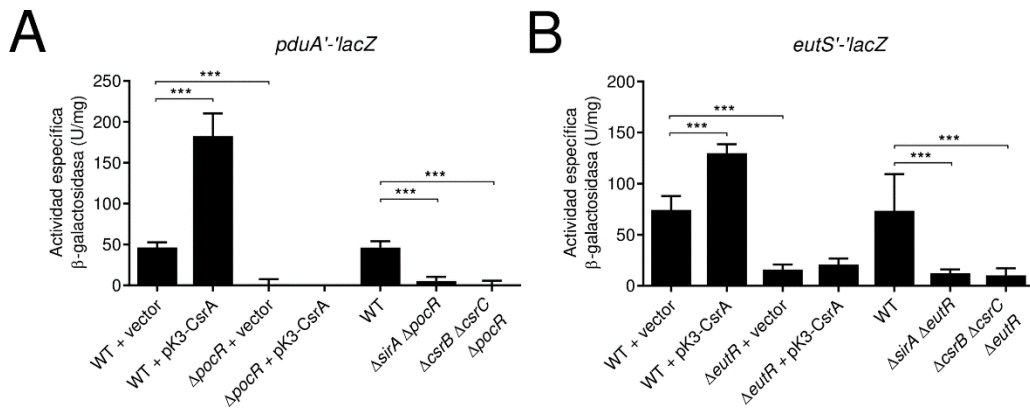


Figura 14. La cascada SirA-CsrB/C-CsrA requiere de PocR y EutR para regular la expresión de los genes *pdu* y *eut*. La expresión de la fusión traduccional *pduA'-lacZ* (A) y *eutS'-lacZ* (B), contenidas en plásmidos, se analizó en las cepas indicadas. La actividad específica β-galactosidasa se determinó a partir de muestras de cultivos crecidos en medio LB durante toda la noche (16 h). Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes hechos por duplicado. ***, representa una diferencia significativa entre las cepas indicadas, con un valor de $p < 0.001$.

7.3 SirA, CsrB/C y CsrA regulan la expresión de PocR y EutR

Nuestros resultados anteriores sugieren que SirA-CsrB/C-CsrA regulan la expresión de los genes *pdu* y *eut* a través de PocR y EutR. Entonces, evaluamos si SirA-CsrB/C-CsrA controla la expresión de estos reguladores.

El gen *pocR* se encuentra corriente arriba de los genes *pdu* (Figura 12A). Entonces, construimos la fusión traduccional *pocR'-lacZ* que contiene la región intergénica corriente arriba y los primeros codones de *pocR* (Figura 12A) y analizamos la expresión de esta fusión en las diferentes cepas de *S. Typhimurium*. La expresión de *pocR'-lacZ* se incrementó en las cepas mutantes $\Delta sirA$ y $\Delta csrB \Delta csrC$, así como en la cepa WT que sobre-expresa a CsrA (Figura 15A). Además, la expresión de esta fusión disminuyó por la sobre-expresión de SirA o CsrB (Figura 15A). Consistente con estos resultados, la sobre-expresión de CsrA incrementó 3.4 veces la expresión cromosomal de PocR-FLAG en la cepa WT (Figura 15B). Estos resultados indican que la cascada SirA-CsrB/C-CsrA regula la expresión de *pocR*. Para determinar si se requiere PocR para esta regulación, evaluamos la expresión de la fusión *pocR'-lacZ* en las cepas mutantes $\Delta sirA \Delta pocR$, $\Delta csrB \Delta csrC \Delta pocR$ o en las cepas WT o $\Delta pocR$ que sobre-expresan a CsrA. La ausencia de SirA o CsrB/C, así como la sobre-expresión de CsrA, incrementó la expresión de *pocR'-lacZ* en las mutantes de $\Delta pocR$ (Figura 16A), lo que indica que PocR no se requiere para la regulación del gen *pocR* por la cascada SirA-CsrB/C-CsrA.

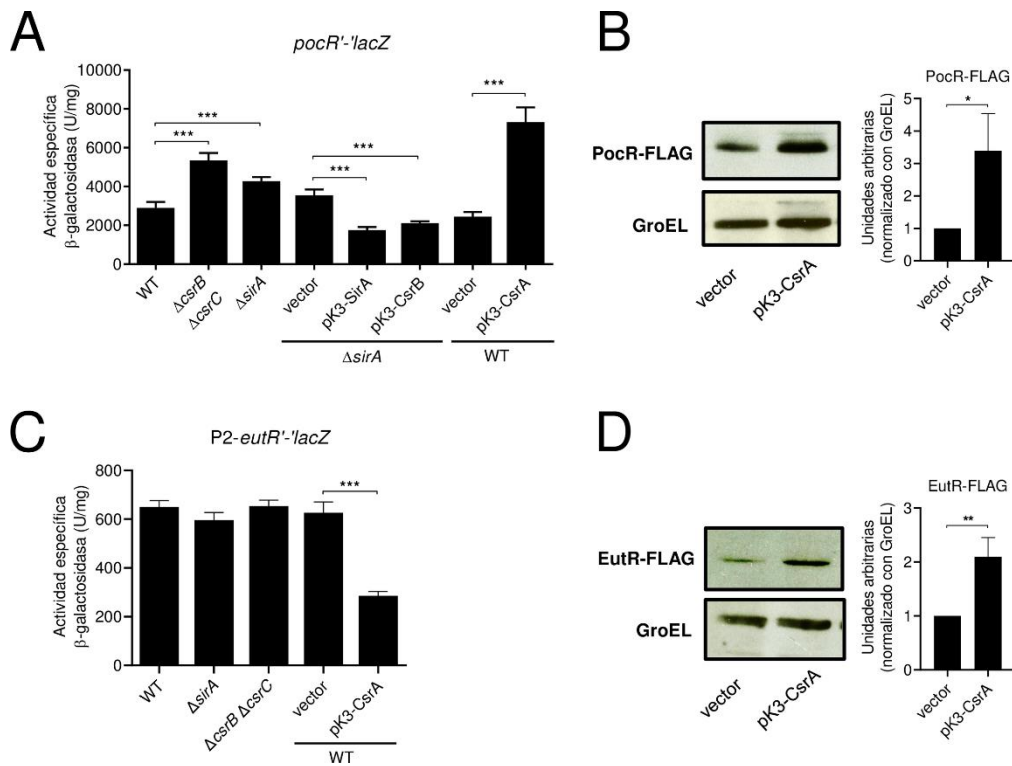


Figura 15. La cascada SirA-CsrB/C-CsrA regula la expresión de PocR y EutR. La expresión de la fusión traduccional *pocR'-lacZ* (A) y *P2-eutR'-lacZ* (C), contenidas en plásmidos, se analizó en las cepas indicadas. Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes hechos por duplicado. ***, representa una diferencia significativa entre las cepas indicadas, con un valor de $p < 0.001$. La expresión de PocR-FLAG (B) y EutR-FLAG (D) se analizó mediante Western blot usando el anticuerpo monoclonal anti-FLAG, en la cepa WT con los plásmidos indicados. Como control de carga, se analizó la expresión de GroEL, usando el anticuerpo policlonal anti-GroEL. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes. Los análisis por densitometría se realizaron con el software ImageJ. * y **, representa una diferencia significativa entre las cepas indicadas, con un valor de $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente. Los ensayos de Western blot y de actividad específica β -galactosidasa se determinaron a partir de muestras de cultivos crecidos en medio LB durante toda la noche (16 h).

La fusión *pocR'-lacZ* se expresó a niveles similares en la cepa WT y en su derivada mutante Δ *pocR* (Figura 16A), lo cual indica que PocR no regula su propia expresión. Esto último se confirmó mediante ensayos de retardamiento en gel (EMSA) con la proteína MBP-PocR purificada y la región promotora de *pocR* y *pduA*. La proteína MBP-PocR se unió específicamente a la región promotora de *pduA*, pero no se unió a la región promotora de *pocR* o a la del control negativo *eutR* (Figura 16B y C). Estudios previos indican que PocR activa la expresión de los genes *pdu* pero no a *pocR* (Chen et al., 1995), lo que concuerda con nuestros resultados. Es importante hacer notar que la unión de PocR al promotor del gen *pduA* no se había reportado previamente.

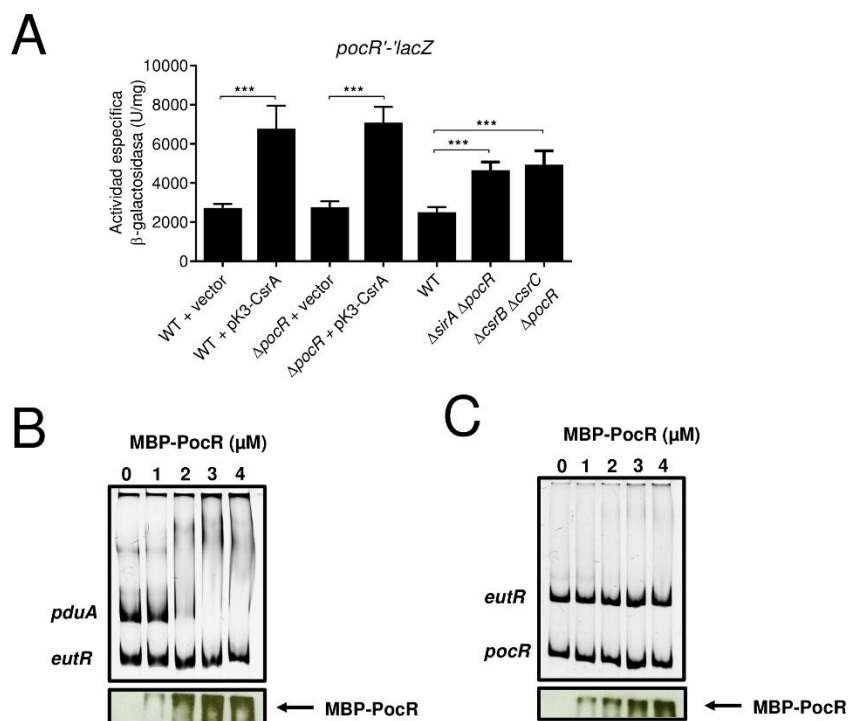


Figura 16. La cascada SirA-CsrB/C-CsrA regula la expresión de *pocR* en ausencia de PocR. (A) La expresión de la fusión traduccional *pocR'-lacZ*, contenida en plásmido, se analizó en las cepas indicadas. La actividad específica β-galactosidasa se determinó a partir de muestras de cultivos crecidos en medio LB durante toda la noche (16 h). Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes hechos por duplicado. ***, representa una diferencia significativa entre las cepas indicadas, con un valor de $p < 0.001$. EMSAs no radioactivos usando la proteína MBP-PocR purificada y los fragmentos de DNA contenidos en las fusiones *pduA'-lacZ* (**B**) y *pocR'-lacZ* (**C**). El fragmento de DNA contenida en la fusión P2-*eutR'-lacZ* se utilizó como control negativo. Los ensayos de inmunodetección usando anticuerpos monoclonales anti-MBP (paneles inferiores), muestran que la proteína MBP-PocR forma complejos grandes con o sin DNA unido, los cuales permanecen cerca de los pozos de los genes. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

eutR es el último gen del operón *eut* y se transcribe principalmente a través del promotor corriente arriba de *eutS*; sin embargo, se ha descrito un promotor adicional corriente arriba de *eutR* (Figura 12B) (Roof & Roth, 1992). Nuestros resultados muestran que la cascada SirA-CsrB/C-CsrA controla la expresión de *eutS* (Figura 13B), lo que sugiere que SirA-CsrB/C-CsrA podrían regular la expresión de *eutR*. Consistente con esto, la sobre-expresión de CsrA incrementó 2.1 veces la expresión de EutR-FLAG en la cepa WT (Figura 15D). Para determinar si la cascada SirA-CsrB/C-CsrA regula la expresión de una fusión mediada por el promotor P2 localizado corriente arriba de *eutR* (Figura 12B), construimos y analizamos la fusión traduccional P2-*eutR'-lacZ*. La ausencia de SirA o CsrB/C no afectó la expresión de la fusión P2-*eutR'-lacZ* (Figura 15C); sin embargo, la sobre-expresión de CsrA disminuyó la expresión de la fusión P2-*eutR'-lacZ* en la cepa WT (Figura 15C), un efecto diferente al observado para CsrA sobre la expresión de *eutS* y EutR-FLAG, así como de *pduA*, *pocR* y PocR-FLAG.

En conjunto, estos resultados indican que la cascada SirA-CsrB/C-CsrA regula la expresión de *pocR* mediante el transcrito generado por el promotor corriente arriba de

este gen, y también regulan la expresión de *eutR* mediante el transcrito generado por el promotor corriente arriba de *eutS*.

7.4 SirA y CsrB/C regulan la expresión de *pdu* y *eut* en presencia de sus moléculas inductoras

La expresión de los genes *pdu* y *eut* se activa a niveles máximos en presencia de propanediol y etanolamina, respectivamente; la vitamina B₁₂ también actúa como una molécula inductora de la expresión de los genes *eut* (Chen et al., 1995; Roof & Roth, 1992; Sheppard & Roth, 1994). Entonces, evaluamos la expresión de las fusiones *pduA*'-'*lacZ* y *eutS*'-'*lacZ* en presencia de propanediol y vitamina B₁₂ o etanolamina y vitamina B₁₂, respectivamente. La expresión de las fusiones *pduA*'-'*lacZ* y *eutS*'-'*lacZ* se incrementó significativamente en las cepas mutantes Δ *sirA* y Δ *csrB* Δ *csrC* en presencia de los moléculas inductoras (Figura 17). Estos resultados indican que SirA y CsrB/C regulan la expresión de *pduA* y *eutS* en presencia de sus respectivas moléculas inductoras.

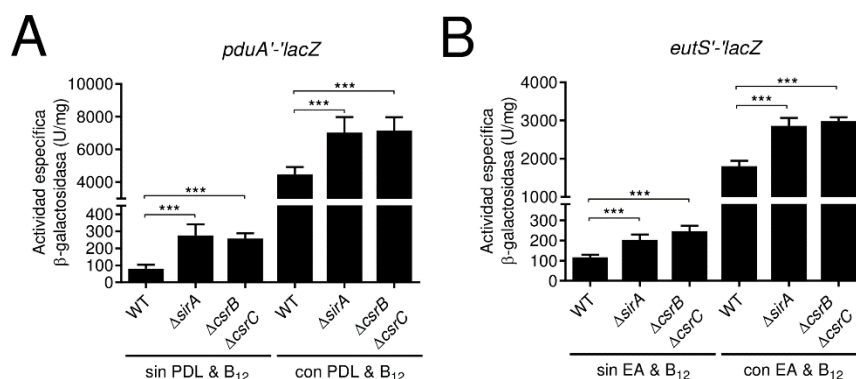


Figura 17. SirA y CsrB/C regulan la expresión de los genes *pdu* y *eut* en presencia de sus moléculas inductoras. La expresión de la fusión traduccional *pduA*'-'*lacZ* (A) y *eutS*'-'*lacZ* (B), contenidas en plásmidos, se analizó en las cepas indicadas, en ausencia o presencia de 12.5 mM de 1,2-propanediol (PDL) y 150 nM de vitamina B₁₂ (A) o de 10 mM de etanolamina (EA) y vitamina B₁₂ (B). La actividad específica β -galactosidasa se determinó a partir de muestras de cultivos crecidos en medio LB durante toda la noche (16 h). Los datos representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes hechos por duplicado. ***, representa una diferencia significativa entre las cepas indicadas, con un valor de $p < 0.001$.

7.5 CsrA se une a los transcritos de *pocR*, *pduA* y *eutS*

Para determinar si CsrA regula directamente la expresión de los genes *pdu* y *eut*, realizamos EMSAs utilizando la proteína CsrA-H6 purificada y los transcritos marcados radioactivamente de *pocR*, *pduA* y *eutS*. La proteína CsrA se unió a los tres transcritos, ya que observamos una reducción de la movilidad debido a la formación del complejo RNA-proteína, a una concentración de CsrA entre 1-8 nM para *pocR*, 8-63 nM para *pduA* y 2-16 nM para *eutS* (Figura 18). Posteriormente se determinó la afinidad de la unión de CsrA a estos transcritos calculando la constante de disociación (K_d). El análisis de estos datos produjo un valor de K_d de 7.4, 31 y 5.7 nM para los RNAs de *pocR*, *pduA* y *eutS*, respectivamente (Figura 18), lo que indica que CsrA tiene mayor afinidad para

pocR y *eutS* que para *pduA*. Además, la especificidad de la interacción de CsrA con los transcritos de *pocR*, *pduA* y *eutS* se evaluó mediante EMSAs competitivos empleando como competidores específicos a los RNAs no marcados de *pocR*, *pduA* y *eutS* y como competidor no específico al RNA de *phoB* no marcado. Los transcritos no marcados de *pocR*, *pduA* y *eutS* son competidores efectivos, puesto que deshicieron el complejo formado por CsrA y los transcritos de *pocR*, *pduA* o *eutS* marcados (Figura 18); en contraste, el transcrito de *phoB* no es capaz de deshacer dicho complejo (Figura 18); esto indica que estas interacciones CsrA-*pocR*, CsrA-*pduA* y CsrA-*eutS* son específicas. En conjunto, nuestros resultados indican que CsrA regula positivamente la expresión de los genes *pdu* al unirse a los transcritos de *pocR* y *pduA* y, además, regula positivamente la expresión de los genes *eut* al unirse al transcrito de *eutS*.

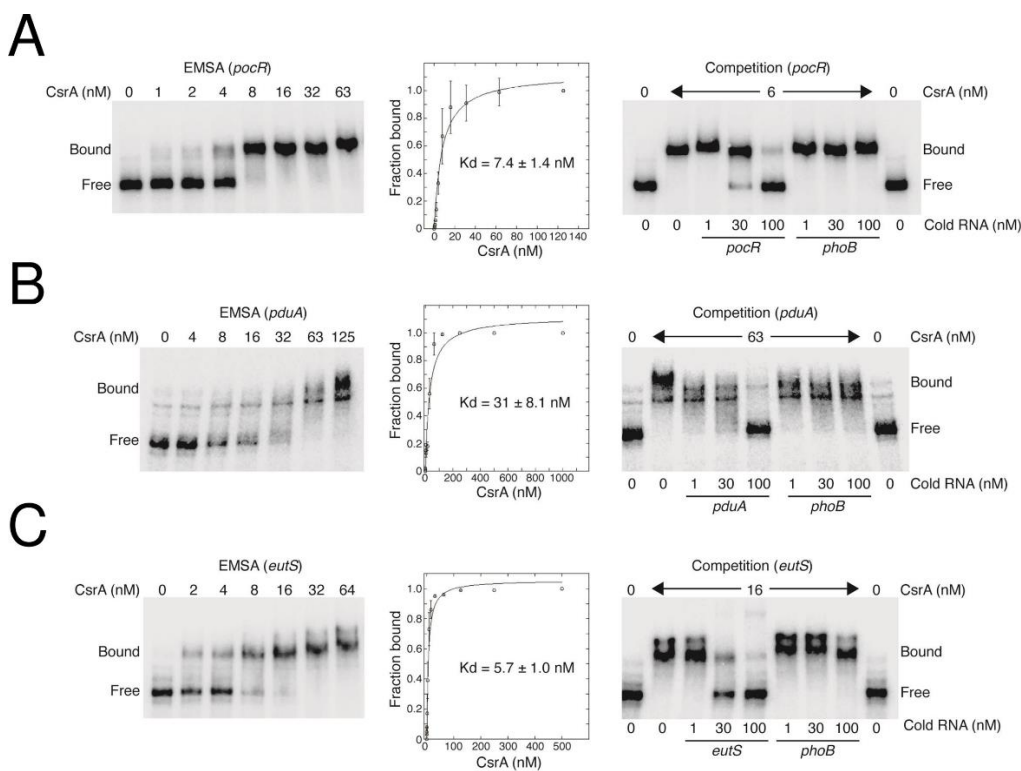


Figura 18. CsrA se une específicamente a los transcritos de *pocR*, *pduA* y *eutS*. Los EMSAs con la proteína CsrA-H6 purificada y los RNAs de *pocR* (A), *pduA* (B) o *eutS* (C) se realizaron incubando los fragmentos de RNA marcados de cada gen en presencia de concentraciones crecientes de CsrA. Se señalan las posiciones de los fragmentos libres (free) o unidos (bound). Además, se muestra la determinación de la constante de disociación K_d de la interacción CsrA con *pocR*, *pduA* y *eutS*. Para los ensayos de competencia, los fragmentos marcados de *pocR*, *pduA* y *eutS* se combinaron con 1, 30 o 100 nM de los competidores específicos (*pocR*, *pduA* y *eutS*) o no específicos (*phoB*) no marcados e incubados con la proteína purificada CsrA. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes.

7.6 Los genes *pdu* y *eut* no se expresan de forma biestable

Nos interesamos en investigar si los genes *pdu* y *eut* se expresan de forma biestable, como sucede con los genes de SPI-1, donde se generan dos subpoblaciones de *Salmonella*, una expresa a SPI-1 y la otra no (Ackermann et al., 2008; Diard et al., 2013; Hautefort et al., 2003; Sánchez-Romero & Casadesús, 2018; Sturm et al., 2011). Para

esto, primeramente, para estandarizar los ensayos y como control positivo de estos, construimos la fusión transcripcional *invF-gfp* (SPI-1) y analizamos su expresión mediante citometría de flujo en la cepa WT de *S. Typhimurium* crecida en LB. Como esperábamos, la fusión de *invF-gfp* se expresó de forma biestable; el 25.6% de las bacterias analizadas expresaron *invF-gfp* y el resto de la población no (74.4%) (Figura 19).

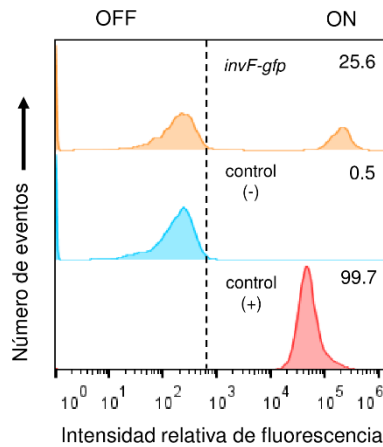


Figura 19. Los genes de SPI-1 se expresan de manera biestable. La expresión de la fusión transcripcional *invF-gfp* (SPI-1), contenida en plásmido, se analizó mediante citometría de flujo en la cepa WT de *S. Typhimurium*. Las muestras se tomaron a las 10 h, analizando 10,000 eventos aproximadamente. En la figura se muestran los histogramas representativos de tres experimentos independientes; además, se indica el porcentaje de la población GFP^{ON}, con respecto a la cepa WT que contiene un plásmido que expresa constitutivamente la proteína GFP (control positivo) o el plásmido que contiene el gen reportero *gfp* sin promotor (control negativo).

Posteriormente, construimos las fusiones transcripcionales *pduA-gfp* y *eutS-gfp* y analizamos su expresión mediante citometría de flujo en la cepa WT crecida en ausencia y presencia de las moléculas inductoras de los genes *pdu* y *eut*. En ausencia de PDL y vitamina B₁₂ o de EA y vitamina B₁₂, la expresión de las fusiones *pduA-gfp* y *eutS-gfp* es baja y no se separa claramente en poblaciones (Figura 20). La expresión de las fusiones *pduA-gfp* y *eutS-gfp* se incrementó en presencia de sus respectivas moléculas inductoras; sin embargo, no se observó expresión diferencial en poblaciones (Figura 20). Estos resultados indican que los genes *pdu* y *eut* no se expresan de forma biestable en las condiciones analizadas.

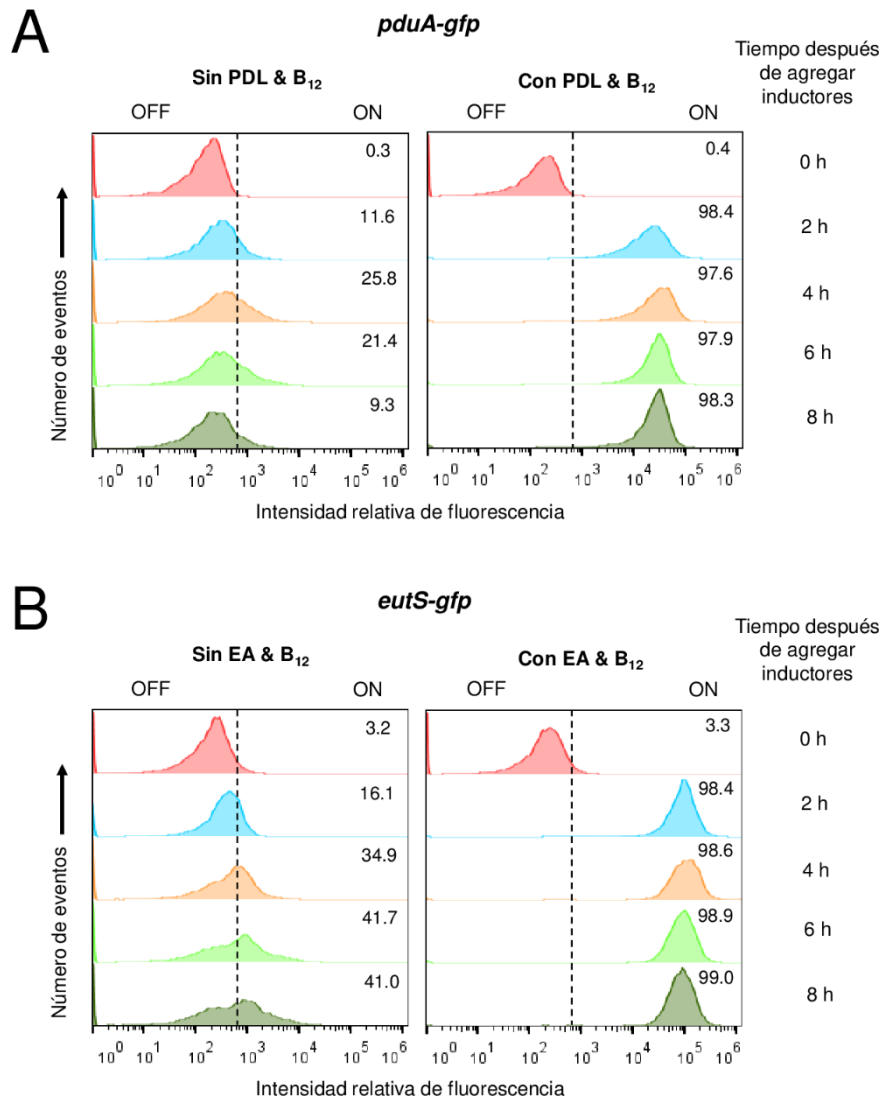


Figura 20. Los genes *pdu* y *eut* no se expresan de manera biestable. La expresión de la fusión transcripcional *pduA-gfp* (**A**) y *eutS-gfp* (**B**), contenidas en plásmidos, se analizó mediante citometría de flujo en la cepa WT de *S. Typhimurium*. Las moléculas inductoras, 12.5 mM de 1,2-propanediol (PDL) y 150 nM de vitamina B₁₂ (**A**) o 10 mM de etanolamina (EA) y 150 nM de vitamina B₁₂ (**B**), se añadieron a una OD_{600nm} de 0.6 (hora 0). Las muestras se tomaron a los tiempos indicados (0, 2, 4, 6 y 8 h), analizando 10,000 eventos aproximadamente. En las figuras se muestran los histogramas representativos de tres experimentos independientes; además, se indica el porcentaje de la población GFP^{ON}.

8. DISCUSIÓN

Dentro del intestino de sus hospederos, *Salmonella* debe contender contra la resistencia a la colonización mediada por la microbiota intestinal (Baümler & Sperandio, 2016; Stecher, 2015). A través de la expresión de los genes de SPI-1, *Salmonella* invade el epitelio intestinal e induce una respuesta inflamatoria en el hospedero, lo que a su vez elimina a gran parte de las bacterias de la microbiota (Stecher et al., 2007). De manera interesante, los genes de SPI-1 se expresan de manera biestable, es decir, que se generan dos subpoblaciones genéticamente idénticas pero fenotípicamente distintas tanto en el modelo de ratón, como en condiciones *in vitro*: una subpoblación expresa a los genes de SPI-1 (SPI-1^{ON}) y la otra no los expresa (SPI-1^{OFF}) (Ackermann et al., 2008; Diard et al., 2013; Hautefort et al., 2003; Sánchez-Romero & Casadesús, 2018; Sturm et al., 2011). La subpoblación SPI-1^{ON} permite la invasión y la generación de las respuestas inflamatorias en el intestino, mientras que la subpoblación SPI-1^{OFF} se replica en el lumen (Ackermann et al., 2008; Diard et al., 2013; Diard & Hardt, 2017; Lawley et al., 2008; Stecher et al., 2007; Sturm et al., 2011). La inflamación en el intestino promueve la generación de aceptores de electrones alternativos, como el tetrionato, que permiten la utilización de fuentes de carbono no fermentables como el propanediol y la etanolamina (Faber et al., 2017; Price-Carter et al., 2001; Thiennimitr et al., 2011; Winter et al., 2010b; Winter et al., 2010a). Esto juega un papel muy importante para la proliferación de *Salmonella* y su posterior transmisión hacia otros hospederos (Lawley et al., 2008; Stecher et al., 2007), por lo que la invasión y replicación luminal son procesos altamente regulados. La cascada de regulación BarA/SirA-CsrB/C-CsrA controla la expresión de los genes de SPI-1 en condiciones inductoras de SPI-1 (Martínez et al., 2011), específicamente BarA/SirA-CsrB/C induce la expresión de estos genes mediante el antagonismo de la represión traduccional de CsrA sobre el transcrito de *hild* (Hung et al., 2019; Martínez et al., 2011), el cual codifica para el regulador maestro de los genes de SPI-1 (Ellermeier et al., 2005; Golubeva et al., 2012; Narm et al., 2020). Los genes *pdu* y *eut* codifican para las enzimas necesarias para el metabolismo del propanediol y la etanolamina, respectivamente (Kaval & Garsin, 2018; Sampson & Bobik, 2008). Los resultados obtenidos del presente trabajo, junto con trabajos previos (Lawhon et al., 2003; Nava-Galeana et al., 2023a; Potts et al., 2019), muestran que la cascada BarA/SirA-CsrB/C-CsrA también regula la expresión de los genes *pdu* y *eut* en condiciones inductoras de SPI-1, pero de una manera opuesta a la regulación que esta cascada ejerce sobre los genes de SPI-1 (Figura 21).

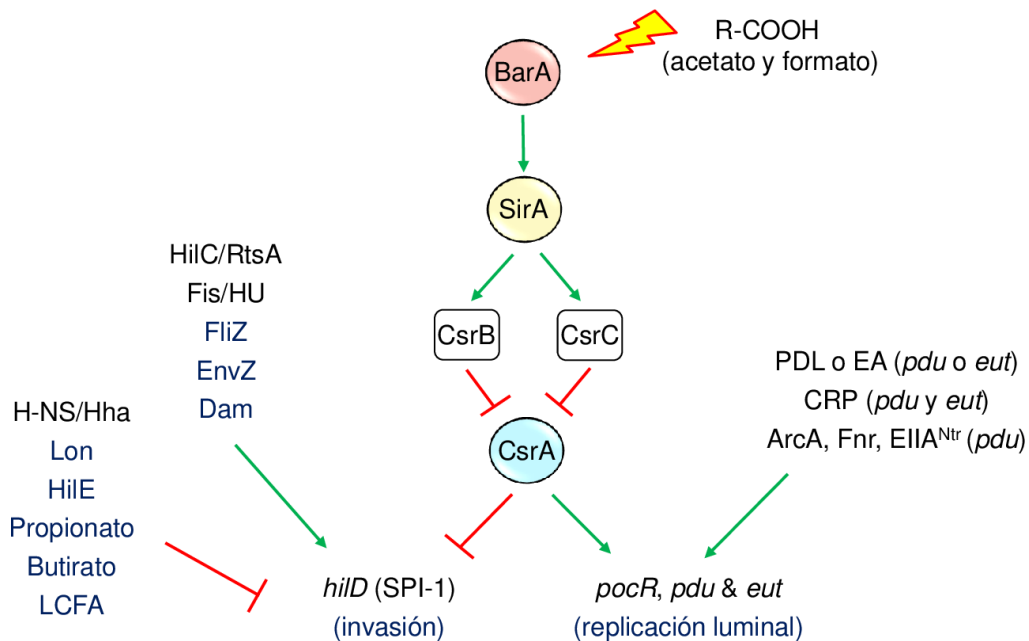


Figura 21. Modelo de la regulación de los genes *pocR/pdu/eut* y *hilD* (SPI-1) por los sistemas BarA/SirA y Csr y por otros mecanismos de regulación. La expresión de los genes *pocR/pdu/eut* y *hilD* (SPI-1), los cuales se requieren para la replicación luminal de *Salmonella*, así como la invasión de sus células hospederas, respectivamente, es controlada de manera opuesta por la cascada BarA-SirA/CsrB/C-CsrA. Las flechas color verde representan regulación positiva, mientras que las líneas romas en color rojo representan regulación negativa. Adicionalmente, la expresión de *pdu/eut* se induce por 1,2-propanediol (PDL) / etanolamina (EA) o por otras vías, mientras que la expresión de los genes de SPI-1 es regulada por otros mecanismos de regulación transcripcional (letras en negro) o postranscripcional (letras en azul). LCFA: ácidos grasos de cadena larga.

Nuestros resultados indican que SirA-CsrB/C controla negativamente la expresión de los genes *pdu* y *eut* a través de antagonizar la regulación positiva y directa de CsrA sobre los transcritos *pocR/pduA* y *eutS*, respectivamente. Además, encontramos que CsrA se une a los transcritos de *pocR* y *eutS* con una afinidad similar a la reportada con su interacción con *hilD* (Martínez et al., 2011), mientras que la afinidad de CsrA por *pduA* es alrededor de 5 veces menor. Aunque CsrA principalmente reprime la traducción de algunos genes blanco (Baker et al., 2002; Irie et al., 2010; Martínez et al., 2011; Pannuri et al., 2012; Pourciau et al., 2020; Romeo et al., 1993; Sabnis et al., 1995; Yakhnin et al., 2011), actualmente se conocen algunos ejemplos de la regulación positiva de CsrA. En particular, CsrA controla positivamente la expresión del regulador transcripcional de los genes flagelares mediante la unión sobre dos sitios en la región 5' del transcrito de *flhDC*, protegiéndolo de la degradación por la RNasa E (Yakhnin et al., 2013). Además, CsrA activa la expresión de YmdA, una proteína de función desconocida, a través de la unión al transcrito de *ymdA* evitando la formación de una estructura tipo tallo-asa que secuestra la secuencia SD, lo que incrementa su estabilidad y su traducción (Renda et al., 2020). En los EMSAs con la proteína CsrA (Figura 18) se utilizó la región -91 a +13, -44 a +38 y -47 a +48 con respecto al codón de inicio de los transcritos *pocR*, *pduA* y *eutS*, respectivamente. Un análisis preliminar de la estructura secundaria de estos transcritos usando el software RNAfold (Gruber et

al., 2008; Lorenz et al., 2011), mostró que su secuencia SD y/o el codón de inicio se encuentran dentro de estructuras tipo tallo-asa (Figura 22), lo que impediría la unión del ribosoma a estos transcritos. Así, es probable que el efecto positivo de CsrA sobre *pocR*, *pduA* y *eutS* sea favorecer la unión del ribosoma a la secuencia SD para su traducción, así como favorecer la estabilidad de estos transcritos; sin embargo, aún queda por determinarse el mecanismo específico por el cual CsrA activa la expresión de estos genes.

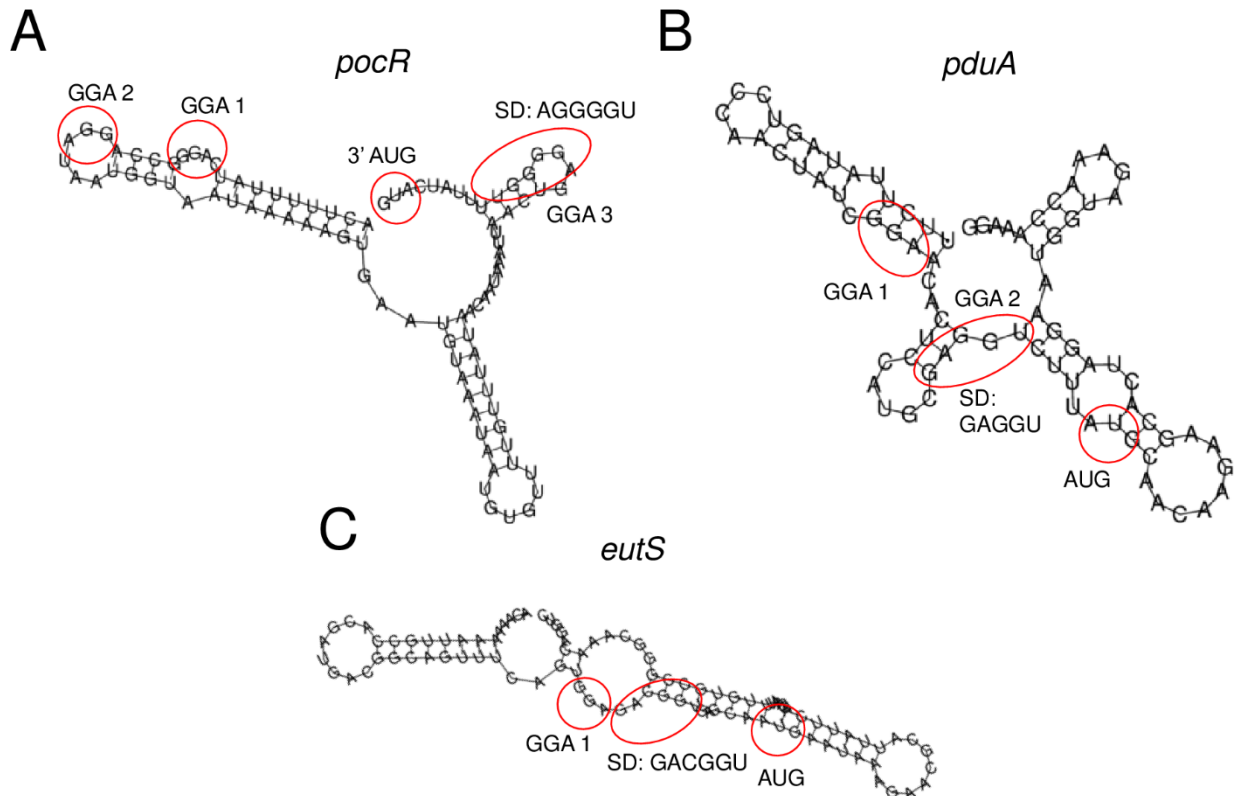


Figura 22. Predicción de la estructura de los transcritos *pocR*, *pduA* y *eutS*. Estructura secundaria de los transcritos *pocR* (A), *pduA* (B) y *eutS* (C) usando el servidor de RNAfold. En la figura se señala el codón de inicio (AUG), la probable secuencia SD y los motivos GGA; algunos de ellos se encuentran dentro de estructuras tipo tallo-asa.

Durante el metabolismo del propanediol y la etanolamina, *Salmonella* utiliza a la vitamina B₁₂ como cofactor para las enzimas propanediol deshidratasa, codificada en los genes *pduCDE*, y por la etanolamina amonio liasa, codificada en los genes *eutBC* (Bobik et al., 1992; Kaval & Garsin, 2018; Roof & Roth, 1989; Sampson & Bobik, 2008; Sheppard et al., 2004). *Salmonella* sintetiza de manera anaeróbica el cofactor B₁₂ a través de las enzimas codificadas en los genes *cbi-cob* (Jeter et al., 1984; Roth et al., 1993, 1996). Además, la reducción del tetrionato requiere de las enzimas tetrionato reductasa, tiosulfato reductasa y sulfito reductasa, codificadas en los operones *ttr*, *phs* y *asr*, respectivamente (Hensel et al., 1999; Price-Carter et al., 2001). De manera interesante, nuestros resultados (Nava-Galeana et al., 2023a) y reportes previos (Lawhon et al., 2003; Potts et al., 2019) apoyan que la cascada BarA/SirA-CsrB/C-CsrA

controla la expresión de los genes *cbi-cob*, *phs* y *asr* de manera similar a la de los genes *pdu* y *eut*.

Que el mismo sistema de regulación controle de manera opuesta la expresión de los genes de SPI-1 y los genes *pdu/eut* sugiere que la cascada BarA/SirA-CsrB/C-CsrA podría participar en la generación de dos poblaciones de *Salmonella* con distintas propiedades de virulencia, una que invade el epitelio intestinal y otra que se replica en el lumen del intestino (Ackermann et al., 2008; Diard et al., 2013; Hautefort et al., 2003; Sánchez-Romero & Casadesús, 2018; Sturm et al., 2011). En este sentido, se esperaría que la población SPI-1^{OFF} estaría expresando los genes *pdu* y *eut*. Sin embargo, en este trabajo observamos que los genes *pdu* y *eut* no se expresan de forma biestable. Aunque en nuestro grupo observamos que SirA se requiere para la generación de la subpoblación SPI-1^{ON} (Pérez-Morales et al., 2021), existen además otros mecanismos de regulación que controlan la biestabilidad de los genes de SPI-1 (Figura 21) (Chowdhury et al., 2021; Figueroa-Bossi et al., 2022). Sin embargo, los sistemas BarA/SirA podrían participar en la temporalidad de la expresión de los genes de SPI-1: en el intestino, las moléculas presentes que activen la expresión del sistema BarA/SirA y, por lo tanto, de los RNAs CsrB/C, activarán la expresión de *hilD* y reprimirán la expresión de los genes *pdu/eut* a través del antagonismo de CsrA. Esto permitiría la invasión y la generación de la inflamación. Posteriormente, cuando se detecte el propanediol o la etanolamina, se expresarán los genes *pdu* o *eut* a través de otras vías. Esto concuerda con estudios previos que indican que los genes *pdu* y *eut* no representan una ventaja en el intestino de ratones infectados con cepas de *S. Typhimurium* mutantes en el SST3-1 que no causan inflamación (Faber et al., 2017; Thiennimitr et al., 2011), ya que, en ausencia de inflamación, no se genera tetrionato que se utiliza como aceptor de electrones durante el metabolismo del propanediol y la etanolamina (Price-Carter et al., 2001; Winter et al., 2010b; Winter et al., 2010a).

Las moléculas o señales presentes en el intestino que actúan a través del TCS BarA/SirA, o de otros sistemas de regulación, podrían determinar si los genes de SPI-1 o los genes *pdu* o *eut* se expresan. Por ejemplo, se ha descrito que los ácidos grasos de cadena corta como el formiato y el acetato actúan a través del TCS BarA/SirA para activar los genes de SPI-1 (Alvarez et al., 2021; Chavez et al., 2010; Huang et al., 2008; Lawhon et al., 2002). Por otra parte, otros ácidos grasos de cadena corta o de cadena larga, como el propionato, butirato, oleato, miristato y palmitato, reprimen la expresión de los genes de SPI-1 (Chowdhury et al., 2021; Gantois et al., 2006; Golubeva et al., 2016; Hung et al., 2013; Lawhon et al., 2002). Es necesario conocer cómo estas moléculas o señales que actúan sobre SPI-1 afectan la expresión de los genes *pdu/eut* o viceversa. En este sentido, en un estudio previo se reportó que el propanediol, el inductor de los genes *pdu*, reprime indirectamente la expresión de SPI-1 mediante la producción de propionato durante el metabolismo del propanediol (Nakayama & Watanabe, 2006).

La alta competencia por nutrientes entre la microbiota y las bacterias patógenas requiere que estas últimas ocupen su propio nicho metabólico para proliferar en el intestino. Los genes asociados con la utilización de metabolitos durante la inflamación, como el propanediol y la etanolamina, no son funcionales en las serovariedades extraintestinales de *Salmonella*, como los serotipos Choleraesuis o Typhi (Nuccio & Bäumler, 2014). Además, los genes *pdu* y *eut* se encuentran en patógenos transmitidos por alimentos, puesto que el propanediol y la etanolamina son abundantes en la comida procesada (Korbel et al., 2005). De manera interesante, los genes *eut* se encontraron en otros 84 genomas secuenciados pertenecientes a diferentes fila, como Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria and Chlorophlexi (Tsoy et al., 2009); no obstante, el número de genes varía entre cada grupo filogenético y algunos de ellos no contienen los genes que codifican para los microcompartimentos (Ravcheev et al., 2019; Staib & Fuchs, 2014; Tsoy et al., 2009). La utilización más efectiva del propanediol y la etanolamina podrían darles una ventaja a las bacterias patógenas sobre la microbiota (Ravcheev et al., 2019; Staib & Fuchs, 2014). En este sentido, los genes *pdu* y *eut* se encuentran en otros patógenos gastrointestinales, como *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *C. difficile*, *Shigella sp.*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* enterohemorrágica y enteropatógena (Staib & Fuchs, 2014). *Salmonella* puede utilizar otras fuentes de carbono (o donadores de electrones), como el lactato (Gillis et al., 2018), galactarato y glucarato (Faber et al., 2016), fructosa-asparagina (Ali et al., 2014), fucosa y ácido siálico (Ng et al., 2013), inositol (Kröger & Fuchs, 2009), formato (Hughes et al., 2017), propionato (Shelton et al., 2022), succinato (Spiga et al., 2017) y H₂ (Maier et al., 2013); además, puede usar diferentes aceptores de electrones como oxígeno (Rivera-Chávez et al., 2016), nitrato (Lopez et al., 2012, 2015), fumarato (Maier et al., 2013; Nguyen et al., 2020), entre otros (Rivera-Chávez & Bäumler, 2015). *Salmonella* encuentra estas moléculas en el intestino inflamado, lo que le permite su proliferación en este nicho, asegurando su transmisión por la vía fecal-oral (Bäumler & Sperandio, 2016; Rivera-Chávez & Bäumler, 2015).

En este trabajo encontramos que CsrA activa la expresión de los genes *pdu* y *eut* mediante la unión directa sobre los transcritos *pocR*, *pduA* y *eutS*, mientras que SirA-CsrB/C reprime la expresión de estos genes mediante el antagonismo del efecto de CsrA. Nuestros resultados indican que la cascada SirA-CsrB/C-CsrA requiere la presencia de los reguladores transcripcionales PocR y EutR para controlar la expresión de los genes *pdu* y *eut*, respectivamente (Figura 23). Debido a la importancia del metabolismo del propanediol y la etanolamina durante la infección por las serovariedades gastrointestinales de *Salmonella* y de otros patógenos que causan infecciones por intoxicación alimentaria, los reguladores transcripcionales o las enzimas involucradas en estas vías podrían servir como blancos terapéuticos para el desarrollo de compuestos antimicrobianos novedosos, tal como los compuestos antivirulencia (Clatworthy et al., 2007; Staib & Fuchs, 2014).

9. CONCLUSIONES

- SirA y CsrB/C controlan negativamente la expresión de los genes *pdu* y *eut*, mientras que CsrA controla positivamente su expresión.
- La regulación de los genes *pdu* y *eut* por la cascada SirA-CsrB/C-CsrA requiere la presencia de PocR y EutR, respectivamente.
- La cascada SirA-CsrB/C-CsrA regula la expresión de *pocR* mediante el transcrito generado por el promotor corriente arriba de este gen, mientras que regula la expresión de *eutR* mediante el transcrito generado por el promotor corriente arriba de *eutS*.
- SirA y CsrB/C controlan negativamente la expresión de los genes *pdu* y *eut* en presencia de sus moléculas inductoras (propanediol y vitamina B₁₂ o etanolamina y vitamina B₁₂).
- CsrA regula positivamente la expresión de los genes *pdu* mediante la unión a los transcritos de *pocR* y *pduA*, así como también regula positivamente la expresión de los genes *eut* mediante la unión al transcrito de *eutS*.
- Los genes *pdu* y *eut* no se expresan de forma biestable.

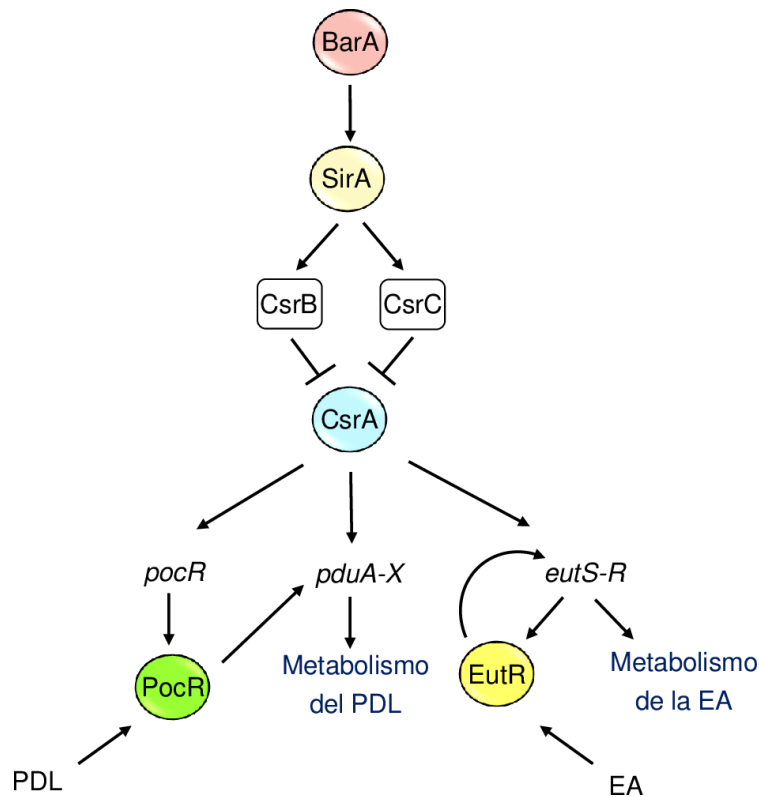


Figura 23. Modelo del mecanismo de regulación de la cascada BarA/SirA-CsrB/C-CsrA sobre la expresión de los genes *pdu* y *eut*. Véase texto para más detalles.

10. PERSPECTIVAS

- Determinar el mecanismo específico que emplea CsrA para controlar positivamente la expresión de *pocR*, *pduA* y *eutS*.
- Definir si y cómo la cascada de regulación BarA/SirA-Csr controla la expresión de otros genes requeridos para la replicación de *Salmonella* en el lumen intestinal.

11. REFERENCIAS

- Ackermann, M., Stecher, B., Freed, N. E., Songhet, P., Hardt, W. D., & Doebeli, M. (2008). Self-destructive cooperation mediated by phenotypic noise. *Nature*, *454*(7207), 987–990.
- Ailion, M., Bobik, T. A., & Roth, J. R. (1993). Two global regulatory systems (Crp and Arc) control the cobalamin/propanediol regulon of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, *175*(22), 7200–7208.
- Ali, M. M., Newsom, D. L., González, J. F., Sabag-Daigle, A., Stahl, C., Steidley, B., Dubena, J., Dyszel, J. L., Smith, J. N., Dieye, Y., Arsenescu, R., Boyaka, P. N., Krakowka, S., Romeo, T., Behrman, E. J., White, P., & Ahmer, B. M. M. (2014). Fructose-asparagine is a primary nutrient during growth of *Salmonella* in the inflamed intestine. *PLoS Pathogens*, *10*(6), e1004209.
- Altier, C., Suyemoto, M., & Lawhon, S. D. (2000). Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion genes by *csrA*. *Infection and Immunity*, *68*(12), 6790–6797.
- Alvarez, A. F., Rodríguez, C., González-Chávez, R., & Georgellis, D. (2021). The *Escherichia coli* two-component signal sensor BarA binds protonated acetate via a conserved hydrophobic-binding pocket. *Journal of Biological Chemistry*, *297*(6), 101383.
- Anantharaman, V., & Aravind, L. (2005). MEDS and PocR are novel domains with a predicted role in sensing simple hydrocarbon derivatives in prokaryotic signal transduction systems. *Bioinformatics*, *21*(12), 2805–2811.
- Anderson, C. J., Clark, D. E., Adli, M., & Kendall, M. M. (2015). Ethanolamine signaling promotes *Salmonella* niche recognition and adaptation during infection. *PLoS Pathogens*, *11*(11), e1005278.
- Andersson, D. I. (1992). Involvement of the Arc system in redox regulation of the Cob operon in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, *6*(11), 1491–1494.
- Andersson, D. I., & Roth, J. R. (1989). Redox regulation of the genes for cobinamide biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, *171*(12), 6734–6739.
- Asten, A. J. A. M., & Dijk, J. E. (2005). Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *44*(3), 251–259.
- Bajaj, V., Hwang, C., & Lee, C. A. (1995). *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Molecular Microbiology*, *18*(4), 715–727.

- Baker, C. S., Morozov, I., Suzuki, K., Romeo, T., & Babitzke, P. (2002). CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *44*(6), 1599–1610.
- Bäumler, A. J., & Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*, *535*(7610), 85–93.
- Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., Ficht, T. A., & Adams, L. G. (1998). Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*, *66*(10), 4579–4587.
- Bäumler, A. J., Winter, S. E., Thiennimitr, P., & Casadesús, J. (2011). Intestinal and chronic infections: *Salmonella* lifestyles in hostile environments. *Environmental Microbiology Reports*, *3*(5), 508–517.
- Baxter, M. A., Fahlen, T. F., Wilson, R. L., & Jones, B. D. (2003). HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infection and Immunity*, *71*(3), 1295–1305.
- Bobik, T. A., Ailion, M., & Roth, J. R. (1992). A single regulatory gene integrates control of vitamin B₁₂ synthesis and propanediol degradation. *Journal of Bacteriology*, *174*(7), 2253–2266.
- Bobik, Thomas A., Havemann, G. D., Busch, R. J., Williams, D. S., & Aldrich, H. C. (1999). The propanediol utilization (*pdu*) operon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 includes genes necessary for formation of polyhedral organelles involved in coenzyme B₁₂-Dependent 1,2-propanediol degradation. *Journal of Bacteriology*, *181*(19), 5967–5975.
- Bustamante, V. H., Martínez, L. C., Santana, F. J., Knodler, L. A., Steele-Mortimer, O., & Puente, J. L. (2008). HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(38), 14591–14596.
- Carter, P. B., & Collins, F. M. (1974). The route of enteric infection in normal mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *139*(5), 1189–1203.
- Chavez, R. G., Alvarez, A. F., Romeo, T., & Georgellis, D. (2010). The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. *Journal of Bacteriology*, *192*(7), 2009–2012.
- Chen, P., Ailion, M., Bobik, T., Stormo, G., & Roth, J. (1995). Five promoters integrate control of the *cob/pdu* regulon in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, *177*(19), 5401–5410.
- Chen, P., Andersson, D. I., & Roth, J. R. (1994). The control region of the *pdu/cob* regulon in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, *176*(17), 5474–5482.
- Chilcott, G. S., & Hughes, K. T. (2000). Coupling of flagellar gene expression to flagellar

- assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 694–708.
- Chowdhury, D., Wang, C., Lu, A., & Zhu, H. (2021). Cis-regulatory logic produces gene-expression noise describing phenotypic heterogeneity in bacteria. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 12, p. 698910).
- Chowdhury, R., Pavinski Bitar, P. D., Keresztes, I., Condo, A. M., & Altier, C. (2021). A diffusible signal factor of the intestine dictates *Salmonella* invasion through its direct control of the virulence activator HilD. *PLOS Pathogens*, 17(2), e1009357.
- Chubiz, J. E. C., Golubeva, Y. A., Lin, D., Miller, L. D., & Slauch, J. M. (2010). FliZ regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion locus by controlling HilD protein activity in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 192(23), 6261–6270.
- Clatworthy, A. E., Pierson, E., & Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, 3(9), 541–548.
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640–6645.
- de Jong, H. K., Parry, C. M., van der Poll, T., & Wiersinga, W. J. (2012). Host–pathogen interaction in invasive Salmonellosis. *PLoS Pathogens*, 8(10), e1002933.
- Diard, M., Garcia, V., Maier, L., Remus-Emsermann, M. N. P., Regoes, R. R., Ackermann, M., & Hardt, W. D. (2013). Stabilization of cooperative virulence by the expression of an avirulent phenotype. *Nature*, 494(7437), 353–356.
- Diard, M., & Hardt, W. D. (2017). Basic processes in *Salmonella*-host interactions: within-host evolution and the transmission of the virulent genotype. *Microbiology Spectrum*, 5(5), 1–11.
- dos Santos, A. M. P., Ferrari, R. G., & Conte-Junior, C. A. (2019). Virulence factors in *Salmonella* Typhimurium: the sagacity of a bacterium. *Current Microbiology*, 76(6), 762–773.
- dos Santos, A. M. P., Ferrari, R. G., & Conte-Junior, C. A. (2020). Type three secretion system in *Salmonella* Typhimurium: the key to infection. *Genes and Genomics*, 42(5), 495–506.
- Dubey, A. K., Baker, C. S., Romeo, T., & Babitzke, P. (2005). RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA*, 11(10), 1579–1587.
- Ellermeier, C. D., Ellermeier, J. R., & Slauch, J. M. (2005). HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three

- secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 57(3), 691–705.
- Faber, F., Thiennimitr, P., Spiga, L., Byndloss, M. X., Litvak, Y., Lawhon, S., Andrews-Polymenis, H. L., Winter, S. E., & Bäumlér, A. J. (2017). Respiration of microbiota-derived 1,2-propanediol drives *Salmonella* expansion during colitis. *PLoS Pathogens*, 13(1), e1006129.
- Faber, F., Tran, L., Byndloss, M. X., Lopez, C. A., Velazquez, E. M., Kerrinnes, T., Nuccio, S. P., Wangdi, T., Fiehn, O., Tsohis, R. M., & Bäumlér, A. J. (2016). Host-mediated sugar oxidation promotes post-antibiotic pathogen expansion. *Nature*, 534(7609), 697–699.
- Fàbrega, A., & Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 308–341.
- Figueroa-Bossi, N., Sánchez-Romero, M. A., Kerboriou, P., Naquin, D., Mendes, C., Bouloc, P., Casadesús, J., & Bossi, L. (2022). Pervasive transcription enhances the accessibility of H-NS-silenced promoters and generates bistability in *Salmonella* virulence gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(30), e2203011119.
- Fookes, M., Schroeder, G. N., Langridge, G. C., Blondel, C. J., Mammina, C., Connor, T. R., Seth-Smith, H., Vernikos, G. S., Robinson, K. S., Sanders, M., Petty, N. K., Kingsley, R. A., Bäumlér, A. J., Nuccio, S.-P., Contreras, I., Santiviago, C. A., Maskell, D., Barrow, P., Humphrey, T., ... Thomson, N. R. (2011). *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the Salmonellae. *PLoS Pathogens*, 7(8), e1002191.
- Forshell, L. P., & Wierup, M. (2006). *Salmonella* contamination: A significant challenge to the global marketing of animal food products. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 25(2), 541–554.
- Frye, J. G., & Jackson, C. R. (2013). Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. *Frontiers in Microbiology*, 4(135), 1–22.
- Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., & Ramos, J. L. (1997). AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), 393–410.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., Hinton, J. C. D., & Van Immerseel, F. (2006). Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 946–949.

- Garsin, D. A. (2010). Ethanolamine utilization in bacterial pathogens: roles and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), 290–295.
- Giammanco, G. M., Pignato, S., Mammina, C., Grimont, F., Grimont, P. A. D., Nastasi, A., & Giammanco, G. (2002). Persistent endemicity of *Salmonella bongori* 48:z35:- in southern Italy: molecular characterization of human, animal, and environmental isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), 3502–3505.
- Gillis, C. C., Hughes, E. R., Spiga, L., Winter, M. G., Zhu, W., Furtado de Carvalho, T., Chanin, R. B., Behrendt, C. L., Hooper, L. V., Santos, R. L., & Winter, S. E. (2018). Dysbiosis-associated change in host metabolism generates lactate to support *Salmonella* growth. *Cell Host and Microbe*, 23(1), 54–64.
- Golubeva, Y. A., Ellermeier, J. R., Chubiz, J. E. C., & 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(1), e02170-15.
- Golubeva, Y. A., Sadik, A. Y., Ellermeier, J. R., & Slauch, J. M. (2012). Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *Genetics*, 190(1), 79–90.
- Grenz, J. R., Cott Chubiz, J. E., Thaprawat, P., & Slauch, J. M. (2018). HilE regulates HilD by blocking DNA binding in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 200(8), e00750-17.
- Grimont, P. A. D., & Weill, F. X. (2007). Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 9th Edition, *Institute Pasteur*, 1–166.
- Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), W70-4.
- Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 53–66.
- Harvey, P. C., Watson, M., Hulme, S., Jones, M. A., Lovell, M., Berchieri, A., Young, J., Bumstead, N., Barrow, P., Al, H. E. T., & Mmun, I. N. I. (2011). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colonizing the lumen of the chicken intestine grows slowly and upregulates a unique set of virulence and metabolism genes. *Infection and Immunity*, 79(10), 4105–4121.
- Hautefort, I., Proença, M. J., & Hinton, J. C. D. (2003). Single-copy green fluorescent protein gene fusions allow accurate measurement of *Salmonella* gene expression *in vitro* and during infection of mammalian cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7480–7491.
- Hensel, M., Hinsley, A. P., Nikolaus, T., Sawers, G., & Berks, B. C. (1999). The genetic

- basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 32(2), 275–287.
- Hoiseth, S. K., & Stocker, B. A. (1981). Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*, 291(5812), 238–239.
- Huang, Y., Suyemoto, M., Garner, C. D., Cicconi, K. M., & Altier, C. (2008). Formate acts as a diffusible signal to induce *Salmonella* invasion. *Journal of Bacteriology*, 190(12), 4233–4241.
- Hughes, E. R., Winter, M. G., Duerkop, B. A., Spiga, L., Furtado de Carvalho, T., Zhu, W., Gillis, C. C., Büttner, L., Smoot, M. P., Behrendt, C. L., Cherry, S., Santos, R. L., Hooper, L. V., & Winter, S. E. (2017). Microbial respiration and formate oxidation as metabolic signatures of inflammation-associated dysbiosis. *Cell Host and Microbe*, 21(2), 208–219.
- Hung, C. C., Eade, C. R., Betteken, M. I., Pavinski Bitar, P. D., Handley, E. M., Nugent, S. L., Chowdhury, R., & Altier, C. (2019). *Salmonella* invasion is controlled through the secondary structure of the *hilD* transcript. *PLoS Pathogens*, 15(4), e1007700.
- Hung, C. C., Garner, C. D., Slauch, J. M., Dwyer, Z. W., Lawhon, S. D., Frye, J. G., McClelland, M., Ahmer, B. M. M., & Altier, C. (2013). The intestinal fatty acid propionate inhibits *Salmonella* invasion through the post-translational control of HilD. *Molecular Microbiology*, 87(5), 1045–1060.
- Ilyas, B., Tsai, C. N., & Coombes, B. K. (2017). Evolution of *Salmonella*-host cell interactions through a dynamic bacterial genome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(428), 1–15.
- Irie, Y., Starkey, M., Edwards, A. N., Wozniak, D. J., Romeo, T., & Parsek, M. R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. *Molecular Microbiology*, 78(1), 158–172.
- Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., de Pinna, E., Nair, S., Fields, P. I., & Weill, F. X. (2014). Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 165(7), 526–530.
- Jajere, S. M. (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*, 12(4), 504–521.
- Jakobson, C. M., Kim, E. Y., Slininger, M. F., Chien, A., & Tullman-Ercek, D. (2015). Localization of proteins to the 1,2-propanediol utilization microcompartment by non-native signal sequences is mediated by a common hydrophobic motif. *Journal of Biological Chemistry*, 290(40), 24519–24533.

- Jakobson, C. M., & Tullman-Ercek, D. (2016). Dumpster diving in the gut: bacterial microcompartments as part of a host-associated lifestyle. *PLoS Pathogens*, *12*(5), e1005558.
- Jeter, R. M., Olivera, B. M., & Roth, J. R. (1984). *Salmonella* Typhimurium synthesizes cobalamin (vitamin B₁₂) de novo under anaerobic growth conditions. *Journal of Bacteriology*, *159*(1), 206–213.
- Kaval, K. G., & Garsin, D. A. (2018). Ethanolamine utilization in bacteria. *MBio*, *9*(1), e00066-18.
- Kelly, A., Goldberg, M. D., Carroll, R. K., Danino, V., Hinton, J. C. D., & Dorman, C. J. (2004). A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, *150*(7), 2037–2053.
- Kofoed, E., Rappleye, C., Stojiljkovic, I., & Roth, J. (1999). The 17-gene ethanolamine (*eut*) operon of *Salmonella typhimurium* encodes five homologues of carboxysome shell proteins. *Journal of Bacteriology*, *181*(17), 5317–5329.
- Korbel, J. O., Doerks, T., Jensen, L. J., Perez-Iratxeta, C., Kaczanowski, S., Hooper, S. D., Andrade, M. A., & Bork, P. (2005). Systematic association of genes to phenotypes by genome and literature mining. *PLoS Biology*, *3*(5), e134.
- Kothary, M. H., & Babu, U. S. (2001). Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: a review. *Journal of Food Safety*, *21*(1), 49–68.
- Kröger, C., & Fuchs, T. M. (2009). Characterization of the *myo*-inositol utilization island of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, *191*(2), 545–554.
- Lamas, A., Miranda, J. M., Regal, P., Vázquez, B., Franco, C. M., & Cepeda, A. (2018). A comprehensive review of non-*enterica* subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiological Research*, *206*, 60–73.
- Lawhon, S. D., Frye, J. G., Suyemoto, M., Porwollik, S., McClelland, M., & Altier, C. (2003). Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, *48*(6), 1633–1645.
- Lawhon, S. D., Maurer, R., Suyemoto, M., & Altier, C. (2002). Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Molecular Microbiology*, *46*(5), 1451–1464.
- Lawley, T. D., Bouley, D. M., Hoy, Y. E., Gerke, C., Relman, D. A., & Monack, D. M. (2008). Host transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is controlled by virulence factors and indigenous intestinal microbiota. *Infection and Immunity*, *76*(1), 403–416.

- Liu, M. Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J. F., Oakford, L., Yüksel, Ü., Giedroc, D. P., & Romeo, T. (1997). The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17502–17510.
- Lopez, C. A., Rivera-Chávez, F., Byndloss, M. X., & Bäumler, A. J. (2015). The periplasmic nitrate reductase NapABC supports luminal growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium during colitis. *Infection and Immunity*, 83(9), 3470–3478.
- Lopez, C. A., Winter, S. E., Rivera-Chávez, F., Xavier, M. N., Poon, V., Nuccio, S. P., Tsolis, R. M., & Bäumler, A. J. (2012). Phage-mediated acquisition of a type III secreted effector protein boosts growth of *Salmonella* by nitrate respiration. *MBio*, 3(3), e00143-12.
- Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner Zu Siederdisen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., & Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*, 6(1), 26.
- Lou, L., Zhang, P., Piao, R., & Wang, Y. (2019). *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and its complex regulatory network. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 270.
- Lupp, C., Robertson, M. L., Wickham, M. E., Sekirov, I., Champion, O. L., Gaynor, E. C., & Finlay, B. B. (2007). Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host and Microbe*, 2(2), 119–129.
- Luzader, D. H., Clark, D. E., Gonyar, L. A., & Kendall, M. M. (2013). EutR is a direct regulator of genes that contribute to metabolism and virulence in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Bacteriology*, 195(21), 4947–4953.
- Maier, L., Vyas, R., Cordova, C. D., Lindsay, H., Schmidt, T. S. B., Brugiroux, S., Periaswamy, B., Bauer, R., Sturm, A., Schreiber, F., Von Mering, C., Robinson, M. D., Stecher, B., & Hardt, W. D. (2013). Microbiota-derived hydrogen fuels *Salmonella* Typhimurium invasion of the gut ecosystem. *Cell Host and Microbe*, 14(6), 641–651.
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., Jones, T. F., Fazil, A., & Hoekstra, R. M. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 882–889.
- Martínez, L. C., Martínez-Flores, I., Salgado, H., Fernández-Mora, M., Medina-Rivera, A., Puente, J. L., Collado-Vides, J., & Bustamante, V. H. (2014). *In silico* identification and experimental characterization of regulatory elements controlling

- the expression of the *Salmonella csrB* and *csrC* genes. *Journal of Bacteriology*, 196(2), 325–336.
- Martínez, L. C., Yakhnin, H., Camacho, M. I., Georgellis, D., Babitzke, P., Puente, J. L., & Bustamante, V. H. (2011). Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Molecular Microbiology*, 80(6), 1637–1656.
- Mercante, J., Edwards, A. N., Dubey, A. K., Babitzke, P., & Romeo, T. (2009). Molecular geometry of CsrA (RsmA) binding to RNA and its implications for regulated expression. *Journal of Molecular Biology*, 392(2), 511–528.
- Mercante, J., Suzuki, K., Cheng, X., Babitzke, P., & Romeo, T. (2006). Comprehensive alanine-scanning mutagenesis of *Escherichia coli* CsrA defines two subdomains of critical functional importance. *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 31832–31842.
- Misselwitz, B., Barrett, N., Kreibich, S., Vonaesch, P., Andritschke, D., Rout, S., Weidner, K., Sormaz, M., Songhet, P., Horvath, P., Chabria, M., Vogel, V., Spori, D. M., Jenny, P., & Hardt, W.-D. (2012). Near surface swimming of *Salmonella* Typhimurium explains target-site selection and cooperative invasion. *PLoS Pathogens*, 8(7), e1002810.
- Moore, T. C., & Escalante-Semerena, J. C. (2016). The EutQ and EutP proteins are novel acetate kinases involved in ethanolamine catabolism: physiological implications for the function of the ethanolamine metabolosome in *Salmonella enterica*. *Molecular Microbiology*, 99(3), 497–511.
- Nakayama, S. I., & Watanabe, H. (2006). Mechanism of *hilA* repression by 1,2-propanediol consists of two distinct pathways, one dependent on and the other independent of catabolic production of propionate, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 188(8), 3121–3125.
- Narm, K.-E., Kalafatis, M., & Slauch, J. M. (2020). HilD, HilC, and RtsA form homodimers and heterodimers to regulate expression of the *Salmonella* Pathogenicity Island I type III secretion system. *Journal of Bacteriology*, 202(9), e00012-20.
- Nava-Galeana, J., Núñez, C., & Bustamante, V. H. (2023a). Proteomic analysis reveals the global effect of the BarA/SirA-Csr regulatory cascade in *Salmonella* Typhimurium grown in conditions that favor the expression of invasion genes. *Journal of Proteomics*, 286, 104960.
- Nava-Galeana, J., Yakhnin, H., Babitzke, P., & Bustamante, V. H. (2023b). CsrA positively and directly regulates the expression of the *pdu*, *pocR*, and *eut* genes

- required for the luminal replication of *Salmonella* Typhimurium. *Microbiology Spectrum*, e0151623.
- Ng, K. M., Ferreyra, J. A., Higginbottom, S. K., Lynch, J. B., Kashyap, P. C., Gopinath, S., Naidu, N., Choudhury, B., Weimer, B. C., Monack, D. M., & Sonnenburg, J. L. (2013). Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature*, 502(7469), 96–99.
- Nguyen, B. D., Cuenca V., M., Hartl, J., Gül, E., Bauer, R., Meile, S., Rüthi, J., Margot, C., Heeb, L., Besser, F., Escriva, P. P., Fetz, C., Furter, M., Laganenka, L., Keller, P., Fuchs, L., Christen, M., Porwollik, S., McClelland, M., ... Hardt, W. D. (2020). Import of aspartate and malate by DcuABC drives H₂/fumarate respiration to promote initial *Salmonella* gut-lumen colonization in mice. *Cell Host and Microbe*, 27(6), 922–936.
- Nuccio, S. P., & Bäumler, A. J. (2014). Comparative analysis of *Salmonella* genomes identifies a metabolic network for escalating growth in the inflamed gut. *MBio*, 5(2), e00929-14.
- Olekhovich, I. N., & Kadner, R. J. (2007). Role of nucleoid-associated proteins Hha and H-NS in expression of *Salmonella enterica* activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion. *Journal of Bacteriology*, 189(19), 6882–6890.
- Palmer, A. D., & Slauch, J. M. (2017). Mechanisms of *Salmonella* pathogenesis in animal models. *Human and Ecological Risk Assessment*, 23(8), 1877–1892.
- Pannuri, A., Yakhnin, H., Vakulskas, C. A., Edwards, A. N., Babitzke, P., & Romeo, T. (2012). Translational repression of NhaR, a novel pathway for multi-tier regulation of biofilm circuitry by CsrA. *Journal of Bacteriology*, 194(1), 79–89.
- Paredes-Amaya, C. C., Valdés-García, G., Juárez-González, V. R., Rudiño-Piñera, E., & Bustamante, V. H. (2018). The Hcp-like protein HilE inhibits homodimerization and DNA binding of the virulence-associated transcriptional regulator HilD in *Salmonella*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(17), 6578–6592.
- Pérez-Morales, D., Nava-Galeana, J., Rosales-Reyes, R., Teehan, P., Yakhnin, H., Melchy-Pérez, E. I., Rosenstein, Y., De La Cruz, M. A., Babitzke, P., & Bustamante, V. H. (2021). An incoherent feedforward loop formed by SirA/BarA, HilE and HilD is involved in controlling the growth cost of virulence factor expression by *Salmonella* Typhimurium. *PLoS Pathogens*, 17(5), e1009630.
- Popa, G. L., & Popa, M. I. (2021). *Salmonella* spp. infection – a continuous threat worldwide. *Germs*, 11(1), 88–96.
- Potts, A. H., Guo, Y., Ahmer, B. M. M., & Romeo, T. (2019). Role of CsrA in stress responses and metabolism important for *Salmonella* virulence revealed by integrated transcriptomics. *PLoS ONE*, 14(1), e0211430.

- Pourciau, C., Lai, Y.-J., Gorelik, M., Babitzke, P., & Romeo, T. (2020). Diverse mechanisms and circuitry for global regulation by the RNA-binding protein CsrA. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 601352.
- Price-Carter, M., Tingey, J., & Roth, J. R. (2001). The alternative electron acceptor tetrathionate supports B₁₂-dependent anaerobic growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol. *Journal of Bacteriology*, *183*(8), 2463–2475.
- Que, F., Wu, S., & Huang, R. (2013). *Salmonella* pathogenicity Island 1(SPI-1) at work. *Current Microbiology*, *66*(6), 582–587.
- Ravcheev, D. A., Moussu, L., Smajic, S., & Thiele, I. (2019). Comparative genomic analysis reveals novel microcompartment-associated metabolic pathways in the human gut microbiome. *Frontiers in Genetics*, *10*, 636.
- Renda, A., Poly, S., Lai, Y., Pannuri, A., Yakhnin, H., Potts, A. H., Bevilacqua, P. C., Romeo, T., & Babitzke, P. (2020). CsrA-mediated translational activation of *ymdA* expression in *Escherichia coli*. *MBio*, *11*(5), e00849-20.
- Richter-Dahlfors, A. A., & Andersson, D. I. (1992). Cobalamin (vitamin B₁₂) repression of the Cob operon in *Salmonella typhimurium* requires sequences within the leader and the first translated open reading frame. *Molecular Microbiology*, *6*(6), 743–749.
- Rivera-Chávez, F., & Bäumler, A. J. (2015). The pyromaniac inside you: *Salmonella* metabolism in the host gut. *Annual Review of Microbiology*, *69*(1), 31–48.
- Rivera-Chávez, F., Lopez, C. A., & Bäumler, A. J. (2017). Oxygen as a driver of gut dysbiosis. *Free Radical Biology and Medicine*, *105*, 93–101.
- Rivera-Chávez, F., Zhang, L. F., Faber, F., Lopez, C. A., Byndloss, M. X., Olsan, E. E., Xu, G., Velazquez, E. M., Lebrilla, C. B., Winter, S. E., & Bäumler, A. J. (2016). Depletion of butyrate-producing *Clostridia* from the gut microbiota drives an aerobic luminal expansion of *Salmonella*. *Cell Host and Microbe*, *19*(4), 443–454.
- Romeo, T., Gong, M., & Liu, M. Y. (1993). Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *Journal of Bacteriology*, *175*(15), 4744–4755.
- Romero-González, L. E., Pérez-Morales, D., Cortés-Avalos, D., Vázquez-Guerrero, E., Paredes-Hernández, D. A., Estrada-de los Santos, P., Villa-Tanaca, L., De la Cruz, M. A., Bustamante, V. H., & Ibarra, J. A. (2020). The *Salmonella* Typhimurium InvF-SicA complex is necessary for the transcription of *sopB* in the absence of the repressor H-NS. *PLOS ONE*, *15*(10), e0240617.
- Rondon, M. R., Kazmierczak, R., & Escalante-Semerena, J. C. (1995). Glutathione is

- required for maximal transcription of the cobalamin biosynthetic and 1,2-propanediol utilization (*cob/pdu*) regulon and for the catabolism of ethanolamine, 1,2-propanediol, and propionate in *Salmonella typhimurium* LT2. *Journal of Bacteriology*, 177(19), 5434–5439.
- Rondon, Michelle R., & Escalante-Semerena, J. C. (1992). The *poc* locus is required for 1,2-propanediol-dependent transcription of the cobalamin biosynthetic (*cob*) and propanediol utilization (*pdu*) genes of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 174(7), 2267–2272.
- Rondon, Michelle R., & Escalante-Semerena, J. C. (1996). In vitro analysis of the interactions between the PocR regulatory protein and the promoter region of the cobalamin biosynthetic (*cob*) operon of *Salmonella typhimurium* LT2. *Journal of Bacteriology*, 178(8), 2196–2203.
- Rondon, Michelle R., & Escalante-Semerena, J. C. (1997). Integration host factor is required for 1,2-propanediol-dependent transcription of the *cob/pdu* regulon in *Salmonella typhimurium* LT2. *Journal of Bacteriology*, 179(11), 3797–3800.
- Roof, D. M., & Roth, J. R. (1989). Functions required for vitamin B₁₂-dependent ethanolamine utilization in *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 171(6), 3316–3323.
- Roof, David M, & Roth, J. R. (1988). Ethanolamine utilization in *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 170(9), 3855–3863.
- Roof, David M, & Roth, J. R. (1992). Autogenous regulation of ethanolamine utilization by a transcriptional activator of the *eut* operon in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 174(20), 6634–6643.
- Roth, J. R., Lawrence, J. G., & Bobik, T. A. (1996). Cobalamin (coenzyme B₁₂): synthesis and biological significance. *Annual Review of Microbiology*, 50(1), 137–181.
- Roth, J. R., Lawrence, J. G., Rubenfield, M., Kieffer-Higgins, S., & Church, G. M. (1993). Characterization of the cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthetic genes of *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 175(11), 3303–3316.
- Sabnis, N. A., Yang, H., & Romeo, T. (1995). Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29096–29104.
- Saini, S., Ellermeier, J. R., Slauch, J. M., & Rao, C. V. (2010). The role of coupled positive feedback in the expression of the SPI1 type three secretion system in *Salmonella*. *PLoS Pathogens*, 6(7), e1001025.
- Sampson, E. M., & Bobik, T. A. (2008). Microcompartments for B₁₂-dependent 1,2-

- propanediol degradation provide protection from DNA and cellular damage by a reactive metabolic intermediate. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 2966–2971.
- Sánchez-Romero, M. A., & Casadesús, J. (2018). Contribution of SPI-1 bistability to *Salmonella enterica* cooperative virulence: insights from single cell analysis. *Scientific Reports*, 8(1), 14875.
- Sánchez-Romero, M. A., & Casadesús, J. (2021). Single cell analysis of bistable expression of pathogenicity island 1 and the flagellar regulon in *Salmonella enterica*. *Microorganisms*, 9(2), 210.
- Schleif, R. (2010). AraC protein, regulation of the L-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(5), 779–796.
- Shelton, C. D., Yoo, W., Shealy, N. G., Torres, T. P., Zieba, J. K., Calcutt, M. W., Foegeding, N. J., Kim, D., Kim, J., Ryu, S., & Byndloss, M. X. (2022). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium uses anaerobic respiration to overcome propionate-mediated colonization resistance. *Cell Reports*, 38(1), 110180.
- Sheppard, D. E., & Roth, J. R. (1994). A rationale for autoinduction of a transcriptional activator: ethanolamine ammonia-lyase (EutBC) and the operon activator (EutR) compete for adenosyl- cobalamin in *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 176(5), 1287–1296.
- Sheppard, David E., Penrod, J. T., Bobik, T., Kofoid, E., & Roth, J. R. (2004). Evidence that a B₁₂-adenosyl transferase is encoded within the ethanolamine operon of *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 186(22), 7635–7644.
- Simons, R. W., Houman, F., & Kleckner, N. (1987). Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*, 53(1), 85–96.
- Smits, W. K., Kuipers, O. P., & Veening, J. W. (2006). Phenotypic variation in bacteria: The role of feedback regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 4(4), 259–271.
- Sonck, K. A. J., Kint, G., Schoofs, G., Wauven, C. V., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2009). The proteome of *Salmonella* Typhimurium grown under *in vivo*-mimicking conditions. *Proteomics*, 9(3), 565–579.
- Spiga, L., Winter, M. G., Furtado de Carvalho, T., Zhu, W., Hughes, E. R., Gillis, C. C., Behrendt, C. L., Kim, J., Chessa, D., Andrews-Polymenis, H. L., Beiting, D. P., Santos, R. L., Hooper, L. V., & Winter, S. E. (2017). An oxidative central metabolism enables *Salmonella* to utilize microbiota-derived succinate. *Cell Host and Microbe*, 22(3), 291–301.
- Sridhar, S., & Steele-Mortimer, O. (2016). Inherent variability of growth media impacts the ability of *Salmonella* Typhimurium to interact with host cells. *PLoS ONE*, 11(6),

e0157043.

- Staib, L., & Fuchs, T. M. (2014). From food to cell: nutrient exploitation strategies of enteropathogens. *Microbiology*, *160*(Pt 6), 1020–1039.
- Staib, L., & Fuchs, T. M. (2015). Regulation of fucose and 1,2-propanediol utilization by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1116.
- Stecher, B. (2015). The roles of inflammation, nutrient availability and the commensal microbiota in enteric pathogen infection. *Microbiology Spectrum*, *3*(3), MBP-0008-2014.
- Stecher, B., Hapfelmeier, S., Müller, C., Kremer, M., Stallmach, T., & Hardt, W. D. (2004). Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infection and Immunity*, *72*(7), 4138–4150.
- Stecher, B., Robbiani, R., Walker, A. W., Westendorf, A. M., Barthel, M., Kremer, M., Chaffron, S., Macpherson, A. J., Buer, J., Parkhill, J., Dougan, G., Von Mering, C., & Hardt, W. D. (2007). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biology*, *5*(10), 2177–2189.
- Sturm, A., Heinemann, M., Arnoldini, M., Benecke, A., Ackermann, M., Benz, M., Dormann, J., & Hardt, W. D. (2011). The cost of virulence: retarded growth of *Salmonella* Typhimurium cells expressing type III secretion system 1. *PLoS Pathogens*, *7*(7), e1002143.
- Sturms, R., Streauslin, N. A., Cheng, S., & Bobik, T. A. (2015). In *Salmonella enterica*, ethanolamine utilization is repressed by 1,2-propanediol to prevent detrimental mixing of components of two different bacterial microcompartments. *Journal of Bacteriology*, *197*(14), 2412–2421.
- Takaya, A., Kubota, Y., Isogai, E., & Yamamoto, T. (2005). Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads to downregulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Molecular Microbiology*, *55*(3), 839–852.
- Thiennimitr, P., Winter, S. E., Winter, M. G., Xavier, M. N., Tolstikov, V., Huseby, D. L., Sterzenbach, T., Tsolis, R. M., Roth, J. R., & Bäumler, A. J. (2011). Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(42), 17480–17485.
- Tsoy, O., Ravcheev, D., & Mushegian, A. (2009). Comparative genomics of ethanolamine utilization. *Journal of Bacteriology*, *191*(23), 7157–7164.

- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., & Bossi, L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 15264–15269.
- Vakulskas, C. A., Potts, A. H., Babitzke, P., Ahmer, B. M. M., & Romeo, T. (2015). Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(2), 193–224.
- Valdivia, R. H., & Falkow, S. (1996). Bacterial genetics by flow cytometry: Rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Molecular Microbiology*, 22(2), 367–378.
- Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A., & Gelfand, M. S. (2003). Regulation of the vitamin B₁₂ metabolism and transport in bacteria by a conserved RNA structural element. *RNA*, 9(9), 1084–1097.
- Wagner, C., & Hensel, M. (2011). Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. In *Bacterial Adhesion* (Vol. 715, pp. 17–34).
- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A. K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C. S., Georgellis, D., Babitzke, P., & Romeo, T. (2003). A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 48(3), 657–670.
- Winter, S. E., & Bäumlner, A. J. (2011). A breathtaking feat: to compete with the gut microbiota, *Salmonella* drives its host to provide a respiratory electron acceptor. *Gut Microbes*, 2(1), 58–60.
- Winter, S. E., Lopez, C. A., & Bäumlner, A. J. (2013). The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. *EMBO Reports*, 14(4), 319–327.
- Winter, S. E., Thiennimitr, P., Nuccio, S. P., Haneda, T., Winter, M. G., Wilson, R. P., Russell, J. M., Henry, T., Tran, Q. T., Lawhon, S. D., Gomez, G., Bevins, C. L., Rüssmann, H., Monack, D. M., Adams, L. G., & Bäumlner, A. J. (2009). Contribution of flagellin pattern recognition to intestinal inflammation during *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection. *Infection and Immunity*, 77(5), 1904–1916.
- Winter, S. E., Thiennimitr, P., Winter, M. G., Butler, B. P., Huseby, D. L., Crawford, R. W., Russell, J. M., Bevins, C. L., Adams, L. G., Tsolis, R. M., Roth, J. R., & Bäumlner, A. J. (2010a). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*, 467(7314), 426–429.
- Winter, S. E., Keestra, A. M., Tsolis, R. M., & Bäumlner, A. J. (2010b). The blessings and curses of intestinal inflammation. *Cell Host and Microbe*, 8(1), 36–43.
- Yakhnin, H., Baker, C. S., Berezin, I., Evangelista, M. A., Rassin, A., Romeo, T., & Babitzke, P. (2011). CsrA represses translation of *sdjA*, which encodes the N-

acylhomoserine- L -lactone receptor of *Escherichia coli*, by binding exclusively within the coding region of *sdiA* mRNA. *Journal of Bacteriology*, 193(22), 6162–6170.

- Yakhnin, H., Yakhnin, A. V., Baker, C. S., Sineva, E., Berezin, I., Romeo, T., & Babitzke, P. (2011). Complex regulation of the global regulatory gene *csrA*: CsrA-mediated translational repression, transcription from five promoters by $\text{E}\sigma^{70}$ and $\text{E}\sigma^{\text{S}}$, and indirect transcriptional activation by CsrA. *Molecular Microbiology*, 81(3), 689–704.
- Yakhnin, A. V., Trimble, J. J., Chiaro, C. R., & Babitzke, P. (2000). Effects of mutations in the L -tryptophan binding pocket of the *trp* RNA- binding attenuation protein of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(6), 4519–4524.
- Yakhnin, A. V., Baker, C. S., Vakulskas, C. A., Yakhnin, H., Berezin, I., Romeo, T., & Babitzke, P. (2013). CsrA activates *flhDC* expression by protecting *flhDC* mRNA from RNase E-mediated cleavage. *Molecular Microbiology*, 87(4), 851–866.
- Yoo, W., Choi, J., Park, B., Byndloss, M. X., & Ryu, S. (2021). A nitrogen metabolic enzyme provides *Salmonella* fitness advantage by promoting utilization of microbiota-derived carbon source. *ACS Infectious Diseases*, 7(5), 1208–1220.
- Yoo, W., Kim, D., Yoon, H., & Ryu, S. (2017). Enzyme IIA^{Ntr} regulates *Salmonella* invasion via 1,2-propanediol and propionate catabolism. *Scientific Reports*, 7, 44827.
- Zaslaver, A., Bren, A., Ronen, M., Itzkovitz, S., Kikoin, I., Shavit, S., Liebermeister, W., Surette, M. G., & Alon, U. (2006). A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nature Methods*, 3(8), 623–628.
- Zere, T. R., Vakulskas, C. A., Leng, Y., Pannuri, A., Potts, A. H., Dias, R., Tang, D., Kolaczowski, B., Georgellis, D., Ahmer, B. M. M., & Romeo, T. (2015). Genomic targets and features of BarA-UvrY (-SirA) signal transduction systems. *PLoS ONE*, 10(12), e0145035.

12. ANEXO 1: Medios y soluciones

Medio LB-Miller

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

Medio SOB

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

Medio SOC

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

Medio E 50X

Para 50 mL: Mezclar 0.5 g de MgSO₄•7H₂O, 5 g de ácido cítrico, 25 g de K₂HPO₄ anhidrido y 8.75g de NaNH₄HPO₄•4H₂O. Esterilizar por autoclave a 121°C y 15 psi durante 20 min.

Medio P22

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

Amortiguador SET

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

TAE 50X

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

Amortiguador de carga de DNA 5X

Mezclar 125 mg azul de bromofenol, 125 mg xileno cianol FF, 25 mL glicerol y 25 mL agua Mili Q.

Amortiguador de carga de proteínas 4X

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

Tris-HCl/SDS pH 6.8

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

Tris-HCl/SDS pH 8.8

Para 100 mL: Pesar 18.2 g de Tris base, disolver en 50 mL de agua Mili Q y ajustar el pH a 8.8 con HCl. Entonces, se agregan 0.4g de SDS, se afora a 100 mL y se filtra con filtros de 0.44 μm .

Amortiguador de corrida 4X para proteínas

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

Amortiguador de transferencia para Western blot

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

PBS 10X pH 7.4

Para 1 L: Pesar 80 g de NaCl, 6.1 g de Na_2HPO_4 , 2 g de KH_2PO_4 y 2 g de KCl, disolver en 500 mL de agua Mili Q, ajustar el pH, aforar a 1 L. Esterilizar por autoclave a 121°C y 15 psi durante 20 min.

PBST

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

Solución bloqueadora para Western blot

Mezclar 0.5 g de leche sin grasa en 10 mL de amortiguador PBST

Azul de coomassie R250

Para 1 L: Pesar 0.55 g de azul de coomassie R250, disolver en 500 mL de agua Mili Q, 100 mL de ácido acético glacial y 500 mL de metanol. Agitar con mosca durante toda la noche (16 h) y filtrar con papel Whatman.

TDTT

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

Amortiguador Z 5X

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

13. ANEXO 2: Artículos publicados

Artículos de primer autor publicados durante el doctorado



CsrA Positively and Directly Regulates the Expression of the *pdu*, *pocR*, and *eut* Genes Required for the Luminal Replication of *Salmonella* Typhimurium

Jessica Nava-Galeana,^a Helen Yakhnin,^b  Paul Babitzke,^b  Víctor H. Bustamante^a

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

^bDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Center for RNA Molecular Biology, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA

ABSTRACT Enteric pathogens, such as *Salmonella*, have evolved to thrive in the inflamed gut. Genes located within the *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) mediate the invasion of cells from the intestinal epithelium and the induction of an intestinal inflammatory response. Alternative electron acceptors become available in the inflamed gut and are utilized by *Salmonella* for luminal replication through the metabolism of propanediol and ethanolamine, using the enzymes encoded by the *pdu* and *eut* genes. The RNA-binding protein CsrA inhibits the expression of HilD, which is the central transcriptional regulator of the SPI-1 genes. Previous studies suggest that CsrA also regulates the expression of the *pdu* and *eut* genes, but the mechanism for this regulation is unknown. In this work, we show that CsrA positively regulates the *pdu* genes by binding to the *pocR* and *pduA* transcripts as well as the *eut* genes by binding to the *eutS* transcript. Furthermore, our results show that the SirA-CsrB/CsrC-CsrA regulatory cascade controls the expression of the *pdu* and *eut* genes mediated by PocR or EutR, which are the positive AraC-like transcriptional regulators for the *pdu* and *eut* genes, respectively. By oppositely regulating the expression of genes for invasion and for luminal replication, the SirA-CsrB/CsrC-CsrA regulatory cascade could be involved in the generation of two *Salmonella* populations that cooperate for intestinal colonization and transmission. Our study provides new insight into the regulatory mechanisms that govern *Salmonella* virulence.

IMPORTANCE The regulatory mechanisms that control the expression of virulence genes are essential for bacteria to infect hosts. *Salmonella* has developed diverse regulatory mechanisms to colonize the host gut. For instance, the SirA-CsrB/CsrC-CsrA regulatory cascade controls the expression of the SPI-1 genes, which are required for this bacterium to invade intestinal epithelium cells and for the induction of an intestinal inflammatory response. In this study, we determine the mechanisms by which the SirA-CsrB/CsrC-CsrA regulatory cascade controls the expression of the *pdu* and *eut* genes, which are necessary for the replication of *Salmonella* in the intestinal lumen. Thus, our data, together with the results of previous reports, indicate that the SirA-CsrB/CsrC-CsrA regulatory cascade has an important role in the intestinal colonization by *Salmonella*.

KEYWORDS Csr, *Salmonella*, regulation

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S.* Typhimurium) causes intestinal disease in humans and many animals (1). Two groups of genes are primarily responsible for mediating intestinal colonization by *S.* Typhimurium: the SPI-1 (*Salmonella* pathogenicity island 1) genes and the *pdu/eut* genes. The SPI-1 genes encode a type three secretion system (TTSS-1), several effector proteins, and transcriptional regulators, which mediate the invasion of intestinal epithelium cells as well as an intestinal inflammatory response (2, 3). The *pdu* and *eut* genes encode enzymes that provide *Salmonella* with the ability to grow

Editor Fernando Navarro-García, Cinvestav-IPN

Copyright © 2023 Nava-Galeana et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Víctor H. Bustamante, victor.bustamante@ibt.unam.mx. The authors declare no conflict of interest.

Received 10 April 2023

Accepted 26 May 2023

in the presence of propanediol and ethanolamine, respectively, which are nonfermentable carbon compounds that are metabolized in the lumen of the inflamed intestine via tetra-thionate respiration (4–7). In laboratory conditions, the SPI-1 genes are expressed when *Salmonella* is grown in lysogeny broth (LB) (under SPI-1-inducing conditions) (8, 9). The *pdu* and *eut* genes are expressed in LB at low levels, and their expression is activated in the presence of propanediol or ethanolamine, respectively (10, 11).

A myriad of regulators control the expression of the SPI-1 genes, most of which act on HilD, which is an AraC-like transcriptional regulator that is encoded within SPI-1 that directly or indirectly activates the expression of the SPI-1 genes and other related genes that are located outside of SPI-1 (2, 3, 12). Among the regulators controlling HilD are the BarA/SirA two-component system (TCS) and the Csr system (12, 13). The BarA/SirA and Csr systems are present in numerous bacteria, in which they control a wide variety of cellular processes by acting in a regulatory cascade (14, 15). The BarA/SirA TCS activates the transcription of the *csrB* and *csrC* genes encoding the CsrB and CsrC (CsrB/C) small RNAs (sRNAs), which bind to the RNA-binding protein CsrA (16, 17). CsrA binds to sequences containing conserved GGA motifs, which are generally located within the loops of hairpin structures in RNAs (18, 19). CsrB and CsrC contain multiple CsrA-binding sites, and they therefore antagonize CsrA activity on target transcripts (20, 21). The most common CsrA-mediated regulatory mechanism involves CsrA binding to multiple sites in 5' RNA leader regions, one of which overlaps the Shine-Dalgarno (SD) sequence, thereby repressing translational initiation, which often leads to the degradation of mRNAs (15, 22–27). However, CsrA can also activate the expression of some genes either by binding to leader sequences in mRNAs and thereby preventing the formation of secondary structures that sequester the SD sequence or by protecting mRNAs from attack by RNases and thereby stabilizing transcripts (15, 28, 29). CsrA binds to the *hilD* mRNA and blocks its translation, while the BarA/SirA TCS activates the expression of the CsrB/C sRNAs that antagonize the effect of CsrA, thereby favoring the expression of *hilD* (13, 30).

The expression of the *pdu* and *eut* genes is positively controlled by the AraC-like transcriptional regulators PocR and EutR, respectively (10, 11, 31, 32). Additionally, global expression studies implicate the BarA/SirA and Csr systems in the regulation of the expression of the *pdu* and *eut* genes (33, 34). However, the mechanism for this regulation is unknown. In this study, we show that CsrA activates the expression of the *pdu* and *eut* genes by directly binding to the *pocR*, *pduA*, and *eutS* transcripts, while SirA-CsrB/C reduces the expression of these genes by counteracting the effect of CsrA. Our results indicate that the regulation of the *pdu* and *eut* genes by the SirA-CsrB/C-CsrA cascade requires the presence of the transcriptional regulators PocR and EutR, respectively.

RESULTS

SirA, CsrB/C, and CsrA regulate *pdu* and *eut* expression. To examine the regulation of the *pdu* and *eut* genes by SirA, CsrB/C, and CsrA, we first constructed plasmids with *lacZ* translational fusions carrying the full-length intergenic regulatory region upstream and the first codons of the *pduA* or *eutS* genes (the *pduA* and *eutS* are the first genes of the *pdu* and *eut* operons, respectively) (Fig. 1). Then, the expression of the generated *pduA*'-'*lacZ* and *eutS*'-'*lacZ* translational fusions was quantified in the WT *S. Typhimurium* SL1344 strain and its isogenic Δ *sirA* and Δ *csrB* Δ *csrC* mutants, as well as in the WT strain overexpressing CsrA and in the Δ *sirA* mutant overexpressing SirA or CsrB. We did not analyze the effect of the Δ *csrA* mutant, as this strain presented a severe growth defect (13, 35). The bacterial strains were grown in LB at 37°C, which are conditions under which SirA, CsrB/C, and CsrA control the expression of the SPI-1 virulence genes (SPI-1-inducing conditions) (8, 9). The expression of both the *pduA*'-'*lacZ* and *eutS*'-'*lacZ* fusions was increased in the Δ *sirA* and Δ *csrB* Δ *csrC* mutants as well as in the WT strain overexpressing CsrA from the plasmid pK3-CsrA, compared with the WT strain either with or without an empty vector (Fig. 2). Conversely, the expression of

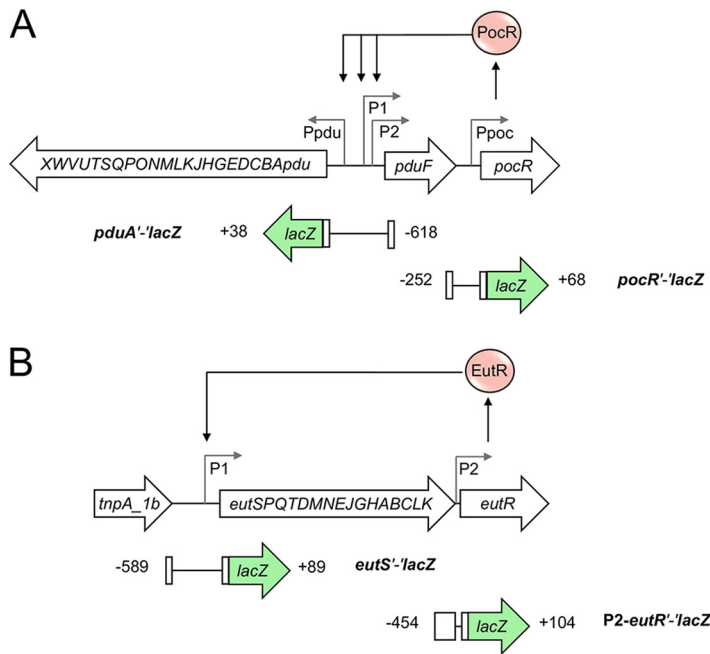


FIG 1 Schematic representation of the *pdu* and *eut* operons. (A) The *pdu* and *pocR* genes. *pduA* is the first gene of the *pdu* operon. The PocR transcriptional regulator activates the expression of the *pdu* genes by acting on the promoters located upstream of *pduA* and *pduF* (adapted from [10]). (B) The *eut* genes. *eutS* is the first gene of the *eut* operon. The EutR transcriptional regulator activates the expression of the *eut* genes by acting on the promoter located upstream of *eutS* (adapted from [73]). The DNA fragments carried by the *pduA*'-*lacZ* and *pocR*'-*lacZ* fusions (A) as well as by the *eutS*'-*lacZ* and *P2-eutR*'-*lacZ* fusions (B) are shown; positions indicated are relative to the translational start codon.

both fusions was decreased in the $\Delta sirA$ mutant overexpressing SirA or CsrB from the plasmids pK3-SirA and pK3-CsrB, respectively, with respect to the $\Delta sirA$ mutant with or without an empty vector (Fig. 2). These results indicate that SirA and CsrB/C negatively control the expression of the *pdu* and *eut* genes, whereas CsrA positively controls their expression.

The regulation of *pdu* and *eut* by SirA-CsrB/C-CsrA requires the presence of PocR or EutR. The expression of the *pdu* and *eut* genes is positively controlled by the transcriptional regulators PocR and EutR, respectively (10, 11, 31, 32). Therefore, we asked whether the regulation of *pdu* and *eut* by the SirA-CsrB/C-CsrA cascade involves PocR or EutR. To test this possibility, we examined expression of the *pduA*'-*lacZ* and *eutS*'-*lacZ* fusions in the $\Delta sirA \Delta pocR$, $\Delta csrB \Delta csrC \Delta pocR$, $\Delta sirA \Delta eutR$, and $\Delta csrB \Delta csrC \Delta eutR$ mutant strains as well as in strains overexpressing CsrA (pK3-CsrA) in the presence or absence of PocR or EutR. The increased expression of *pduA*'-*lacZ* and *eutS*'-*lacZ* caused by the absence of SirA or CsrB/C or by the overexpression of CsrA (Fig. 2) was lost in the absence of the respective regulator PocR or EutR; the expression of the *pduA*'-*lacZ* and *eutS*'-*lacZ* fusions was barely detectable in the absence of PocR and EutR, respectively (Fig. 3). These results demonstrate that regulation of the *pdu* and *eut* genes by the SirA-CsrB/C-CsrA cascade requires the presence of PocR and EutR, respectively.

SirA, CsrB/C, and CsrA regulate PocR and EutR expression. Our results suggest that SirA-CsrB/C-CsrA regulates the *pdu* and *eut* genes through PocR and EutR. Therefore, we sought to determine whether SirA-CsrB/C-CsrA controls the expression of PocR and EutR.

The *pocR* gene is located near the *pdu* genes, and it is expressed as a single gene operon (Fig. 1A). We constructed a *pocR*'-*lacZ* translational fusion carrying the full-length intergenic region upstream and the first codons of *pocR* (Fig. 1A), and we analyzed the expression of this translational fusion in the different *S. Typhimurium* strains that were assessed in this study. The expression of *pocR*'-*lacZ* increased in the absence

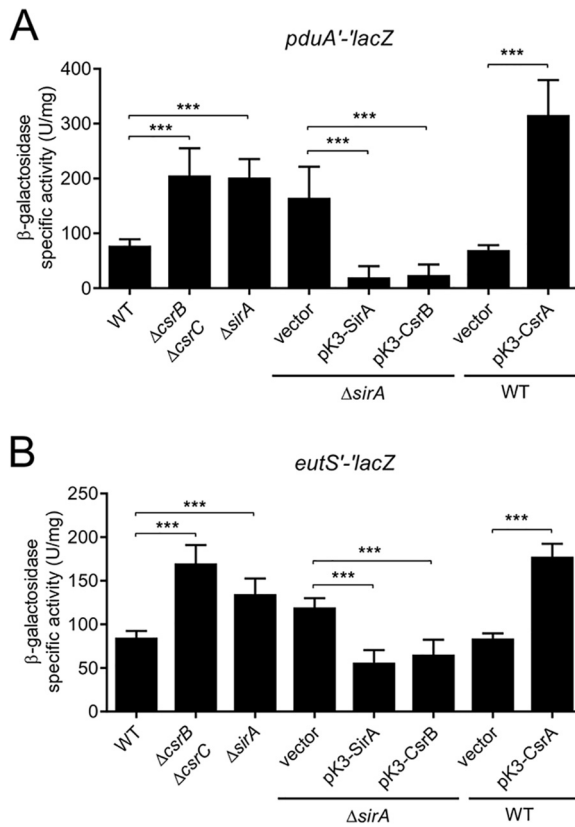


FIG 2 The SirA-CsrB/C-CsrA cascade regulates the expression of the *pdu* and *eut* genes. The β -galactosidase activity of the *pduA'-lacZ* (A) and *eutS'-lacZ* (B) translational fusions was quantified in the indicated strains. β -galactosidase assays were performed with samples taken from bacterial cultures that were grown overnight in LB at 37°C. The data represent the average and the standard deviation of three independent experiments done in duplicate. The *P* values were calculated using one-way ANOVAs with Tukey's *post hoc* tests (***, *P* < 0.001).

of SirA or CsrB/C and by the overexpression of CsrA from pK3-CsrA (Fig. 4A). Conversely, the expression of this fusion decreased by the expression of SirA or CsrB from pK3-SirA and pK3-CsrB, respectively (Fig. 4A). Consistent with these results, the production of CsrA from pK3-CsrA increased the chromosomal expression of 3xFLAG-tagged PocR (PocR-FLAG) by 3.4-fold in the WT strain (Fig. 4B). These results show that the SirA-CsrB/C-CsrA cascade regulates the expression of *pocR*. To determine whether the presence of PocR is required for this regulation, we next examined the expression of the *pocR'-lacZ* fusion in the $\Delta sirA \Delta pocR$ and $\Delta csrB \Delta csrC \Delta pocR$ mutant strains as well as in strains overexpressing CsrA from pK3-CsrA in the WT and $\Delta pocR$ genetic backgrounds. The absence of SirA or CsrB/C as well as the overexpression of CsrA increased the expression of *pocR'-lacZ* in the $\Delta pocR$ mutants (Fig. 5A), indicating that PocR is not required for the regulation of the *pocR* gene by the SirA-CsrB/C-CsrA cascade.

The *pocR'-lacZ* fusion was expressed at similar levels in the WT strain and its isogenic $\Delta pocR$ mutant when both were carrying an empty vector (Fig. 5A), indicating that PocR does not autoregulate its own expression. Consistent with this finding, electrophoretic mobility shift assays (EMSA) showed MBP-PocR binding to the *pduA* promoter region but not to the *pocR* or *eutR* promoters (Fig. 5B and C). In agreement with these findings, previous studies indicated that PocR activates the expression of the *pdu* genes but does not regulate itself (10, 36). It should be noted that PocR binding to the *pduA* promoter had not been determined previously.

eutR is the last gene of the *eut* operon, and it is transcribed primarily from the promoter located upstream of *eutS*; however, an additional promoter upstream of *eutR*

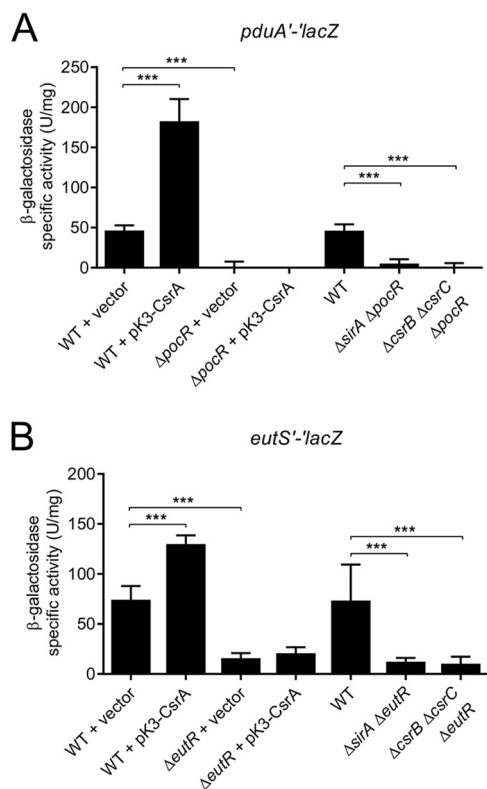


FIG 3 The SirA-CsrB/C-CsrA cascade requires PocR and EutR to regulate the expression of the *pdu* and *eut* genes. The β -galactosidase activity of the *pduA'*-*lacZ* (A) and *eutS'*-*lacZ* (B) translational fusions was quantified in the indicated strains. β -galactosidase assays were performed with samples taken from bacterial cultures that were grown overnight in LB at 37°C. The data represent the average and the standard deviation of three independent experiments done in duplicate. The *P* values were calculated using one-way ANOVAs with Tukey's *post hoc* tests (***, *P* < 0.001).

has been reported (Fig. 1B) (11). Our results show that the SirA-CsrB/C-CsrA cascade controls the expression of *eutS* (Fig. 2B), implying that SirA-CsrB/C-CsrA would also regulate the expression of *eutR*. Consistent with this prediction, the production of CsrA from pK3-CsrA increased the chromosomal expression of 3xFLAG-tagged EutR (EutR-FLAG) by 2.1-fold in the WT strain (Fig. 4D). To determine whether the SirA-CsrB/C-CsrA cascade also regulates the expression of a translational fusion driven by promoter P2 immediately upstream of *eutR* (Fig. 1B), we constructed and analyzed a P2-*eutR'*-*lacZ* translational fusion. The absence of SirA or CsrB/C did not affect the expression of the P2-*eutR'*-*lacZ* fusion (Fig. 4C). Intriguingly, the production of CsrA from pK3-CsrA significantly reduced the expression of the P2-*eutR'*-*lacZ* fusion in the WT strain (Fig. 4C), which was an opposite effect to that observed for CsrA on *eutS* and EutR-FLAG (Fig. 2B, 3B, and 4D) as well as on *pduA*, *pocR*, and PocR-FLAG (Fig. 2A, 3A, 4A, 4B, and 5A).

Together, these results indicate that the SirA-CsrB/C-CsrA cascade regulates the expression of *pocR* by acting on the transcript generated by the promoter upstream of this gene and that it regulates the expression of *eutR* by acting on the transcript generated by the promoter upstream of *eutS*.

SirA and CsrB/C regulate *pdu* and *eut* expression in the presence of inducer molecules. The expression of the *pdu* and *eut* genes is activated to high levels in the presence of propanediol and ethanolamine, respectively; vitamin B₁₂ has also been shown to act as an inducer molecule for the expression of the *eut* genes (10, 11, 37). We found that SirA and CsrB/C also control the expression of the *pdu* and *eut* genes in the presence of inducer molecules (propanediol + vitamin B₁₂ or ethanolamine + vitamin B₁₂), but this is to a lower extent than that observed under SPI-1-inducing conditions (lacking inducers) (Fig. 6).

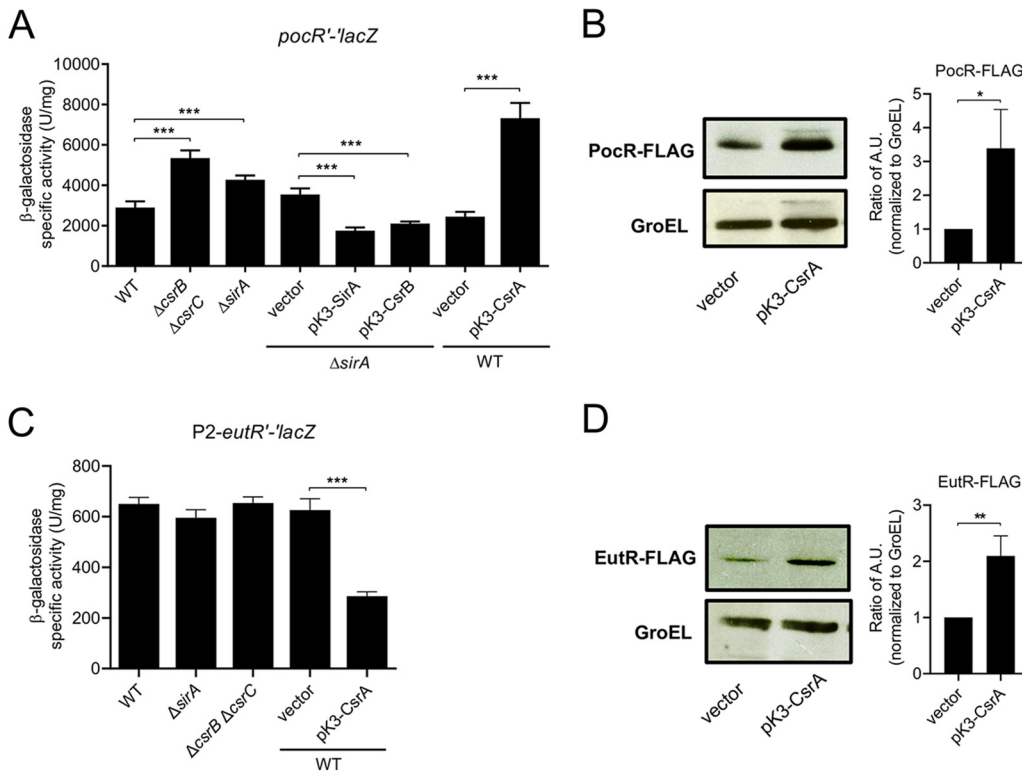


FIG 4 The SirA-CsrB/C-CsrA cascade regulates the expression of PocR and EutR. The β -galactosidase activity of the *pocR'*-*lacZ* (A) and *P2-eutR'*-*lacZ* (C) translational fusions was quantified in the indicated strains. The data represent the average and the standard deviation of three independent experiments done in duplicate. The *P* values were calculated using one-way ANOVAs with Tukey's *post hoc* tests (***, $P < 0.001$). Western blot analysis of PocR-FLAG (B) and EutR-FLAG (D) expression in the WT strain carrying a chromosomal 3xFLAG-tagged *pocR* or *eutR* gene, respectively, with the indicated plasmids. Monoclonal anti-FLAG antibodies were used to detect the FLAG-tagged proteins. As a loading control, the expression of GroEL was also detected using polyclonal anti-GroEL antibodies. The blots were performed three times in independent experiments. Representative images of the blots are shown. The fold change for the expression of FLAG-tagged proteins were calculated as the ratio of AU (arbitrary units) normalized with GroEL, using the ImageJ software package. The *P* values were obtained by using unpaired Student's *t* tests (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). Western blots and β -galactosidase assays were performed with samples taken from bacterial cultures that were grown overnight in LB at 37°C.

CsrA binds to the *pocR*, *pduA*, and *eutS* transcripts. To determine the direct targets of CsrA for the regulation analyzed in this study, we performed EMSAs using purified CsrA-H6 and the 5'-end-labeled RNA of *pocR*, *pduA*, and *eutS*. A band with lower mobility was detected with a CsrA-H6 concentration between 1 and 8 nM for *pocR* RNA, between 8 and 63 nM for *pduA* RNA, and between 2 and 16 nM for *eutS* RNA (Fig. 7), indicating that CsrA binds to these three transcripts. A nonlinear least-squares analysis of these data yielded apparent K_d values of 7.4, 31, and 5.7 nM for *pocR*, *pduA*, and *eutS* RNAs, respectively (Fig. 7), indicating that CsrA has a higher affinity for *pocR* and *eutS* than for *pduA*. Additionally, the specificity of the CsrA interaction with *pocR*, *pduA*, and *eutS* RNAs was evaluated by competition experiments with specific (*pocR*, *pduA*, and *eutS*) and nonspecific (*phoB*) unlabeled RNA competitors. Unlabeled *pocR*, *pduA*, or *eutS* RNAs were effective competitors, whereas *phoB* RNA was not (Fig. 7), indicating that these interactions are specific. Collectively, our results show that CsrA positively regulates the expression of the *pdu* genes by binding to the *pocR* and *pduA* transcripts, and it also positively regulates the expression of the *eut* genes by binding to the *eutS* transcript.

DISCUSSION

In the mouse intestine as well as under SPI-1-inducing *in vitro* conditions, *Salmonella* differentiates into two subpopulations that are genetically identical but phenotypically distinct: one subpopulation expresses SPI-1 genes (SPI-1^{ON}), and the other does not (SPI-1^{OFF})

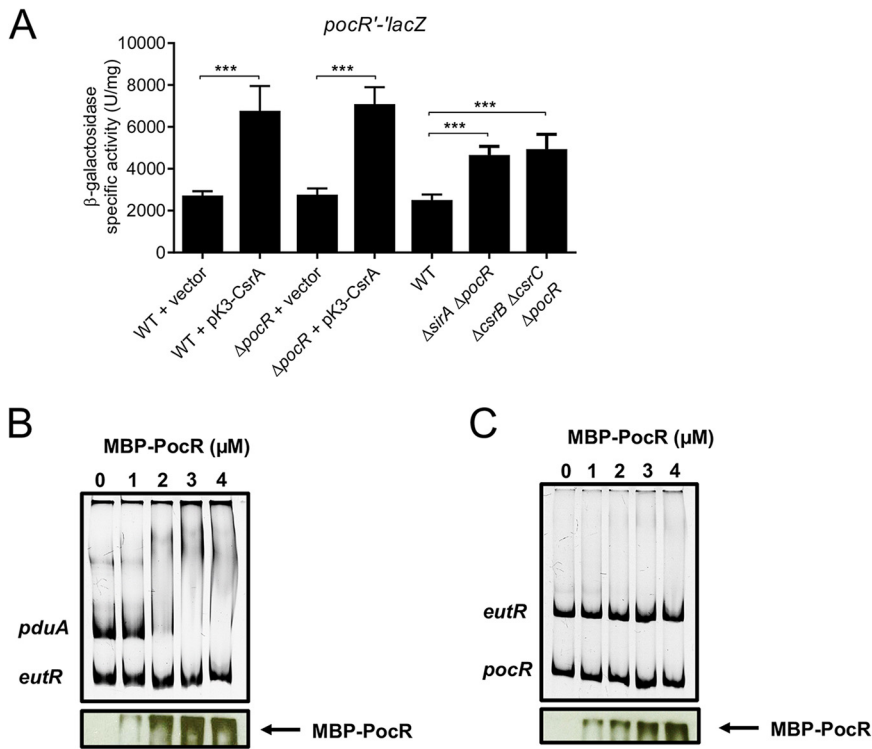


FIG 5 The SirA-CsrB/C-CsrA cascade regulates the expression of *pocR* in the absence of PocR. (A) The β -galactosidase activity of the *pocR'*-*lacZ* translational fusion was quantified in the indicated strains. β -galactosidase assays were performed with samples taken from bacterial cultures that were grown overnight in LB at 37°C. The data represent the average and the standard deviation of three independent experiments done in duplicate. The *P* values were calculated using one-way ANOVAs with Tukey's *post hoc* tests (***, *P* < 0.001). Nonradioactive EMSAs using purified MBP-PocR and the DNA fragments contained in the *pduA'*-*lacZ* (B) and *pocR'*-*lacZ* (C) fusions. As a negative control, the DNA fragment contained in the *eutR'*-*lacZ* fusion was included in each DNA-binding reaction. The immunodetection assays using anti-MBP monoclonal antibodies (the images below the EMSAs) show that the MBP-PocR protein forms overly large complexes with (*pduA*) or without (*pocR* and *eutR*) bound DNA, and these remained near the wells of the gels.

(38–42). Different studies indicate that *Salmonella* colonizes the gut via a division of labor between these two subpopulations: the SPI-1^{ON} is able to invade cells from the intestinal epithelium and trigger an inflammatory response that provides a particular niche where the SPI-1^{OFF} replicates in the intestinal lumen, thereby displacing the microbiota (39–41, 43–45).

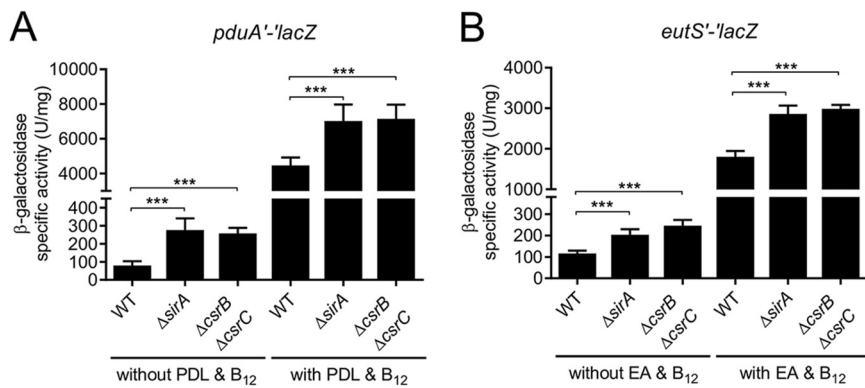


FIG 6 SirA and CsrB/C regulate the expression of the *pdu* and *eut* genes in the absence or presence of inducer molecules. The β -galactosidase activity of the *pduA'*-*lacZ* (A) and *eutS'*-*lacZ* (B) translational fusions was determined in the indicated strains that were grown in the absence or presence of either 12.5 mM 1,2-propanediol and 150 nM vitamin B₁₂ (A) or 10 mM ethanolamine and vitamin B₁₂ (B). β -galactosidase assays were performed with samples taken from bacterial cultures that were grown overnight in LB at 37°C. The data represent the average and the standard deviation of three independent experiments done in duplicate. The *P* values were calculated using one-way ANOVAs with Tukey's *post hoc* tests (***, *P* < 0.001).

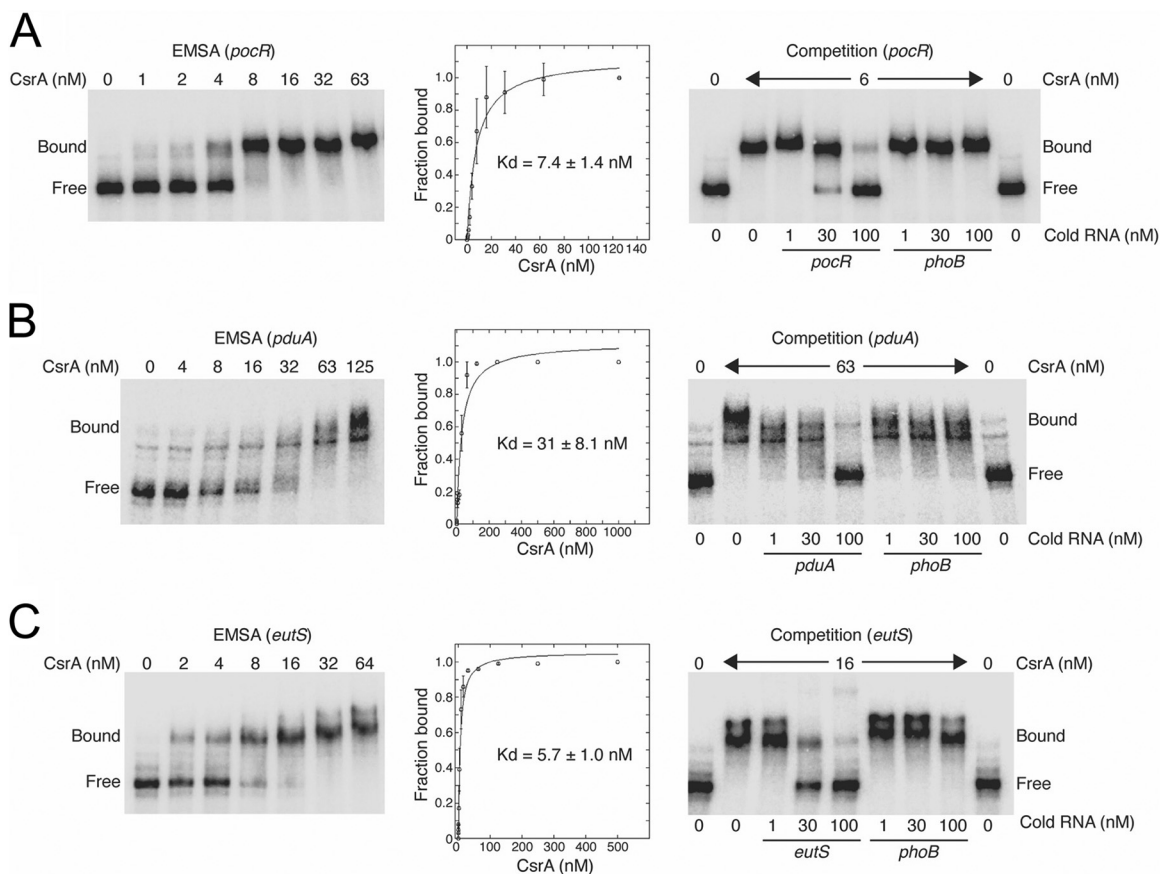


FIG 7 CsrA binds specifically to the *pocR*, *pduA*, and *eutS* transcripts. CsrA binding to the *pocR* (A), *pduA* (B), and *eutS* (C) RNAs was analyzed using EMSAs by incubating 32 P-labeled RNA fragments with increasing concentrations of purified CsrA-H6. The positions of bound and free RNA are marked. The simple binding curves for these data are shown. The K_d values of the CsrA interaction with the *pocR*, *pduA*, and *eutS* transcripts are shown. For the RNA competition experiments, labeled *pocR* (0.1 nM), *pduA* (0.2 nM), or *eutS* (0.2 nM) RNA was combined with 1, 30, or 100 nM unlabeled specific (*pocR*, *pduA*, and *eutS*) or nonspecific (*phoB*) competitor RNA and was incubated with purified CsrA.

Alternative electron acceptors, such as tetrathionate (5), which is utilized by *Salmonella* for propanediol and ethanolamine metabolism (4–7, 46), are generated in the inflamed gut. The *pdu* and *eut* genes encode the enzymes necessary for the use of propanediol and ethanolamine as carbon sources (32, 47). The BarA/SirA-CsrB/C-CsrA regulatory cascade controls the expression of the SPI-1 genes under SPI-1-inducing conditions (13). BarA/SirA-CsrB/C induces the expression of these genes by antagonizing the translational repression exerted by CsrA on the *hilD* transcript (13, 30), which codes for the central positive regulator of SPI-1 (48–50). Recently, we reported that SirA is required for the generation of the SPI-1^{ON} subpopulation (51). Results from the present study, together with the results of previous reports (33, 34), show that the BarA/SirA-CsrB/C-CsrA cascade also controls the expression of the *pdu* and *eut* genes under SPI-1-inducing conditions, but, interestingly, this occurs in a manner that is opposite to that of the control exerted by this regulatory cascade on the SPI-1 genes (Fig. 8). Our data indicate that SirA-CsrB/C negatively controls the *pdu* and *eut* genes by counteracting the direct positive regulation of CsrA on the *pocR*-*pduA* and *eutS* transcripts, respectively. We found that CsrA binds to the *pocR* and *eutS* RNAs with a similar affinity to that reported for its interaction with *hilD* RNA (13) and that the affinity of CsrA for *pduA* RNA was approximately 5-fold lower. CsrA primarily represses the translation of target mRNAs (13, 15, 22–27). However, positive regulation by CsrA on some transcripts has been described. For instance, CsrA positively controls the expression of the master regulator of flagellar genes, namely, FlhD₄C₂, by binding to the *flhDC* mRNA and thereby protecting it from degradation by RNase E (28). Furthermore, CsrA activates the expression of YmdA, which is a protein of unknown function, by binding to the *ymdA* mRNA and thereby exposing the SD sequence

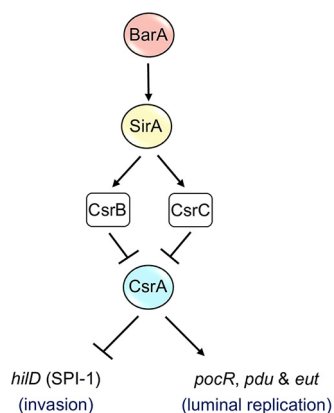


FIG 8 The model for the regulation of the *pdu/pocR/eut* and *hilD* (SPI-1) genes by BarA/SirA-CsrB/C-CsrA. The expression of the *pdu/pocR/eut* and *hilD* (SPI-1) genes that are required for luminal replication and for the invasion of host cells, respectively, is oppositely controlled by the BarA/SirA-CsrB/C-CsrA regulatory cascade. See the text for details.

for translation initiation (29). The precise mechanism(s) by which CsrA activates the expression of *pocR*, *pduA*, and *eutS* remains to be determined.

Vitamin B₁₂ is necessary for the metabolism of propanediol and ethanolamine because it acts as a cofactor for the propanediol dehydratase enzyme that is encoded by the *pdu* genes as well as for the ethanolamine ammonia-lyase enzyme that is encoded by the *eut* genes (31, 32, 47, 52, 53). *Salmonella* anaerobically synthesizes vitamin B₁₂ with the enzymes encoded in the *cbi-cob* operon (36, 54, 55). In addition, the reduction of tetrathionate during the metabolism of propanediol and ethanolamine requires tetrathionate reductase, thiosulphate reductase, and sulfite reductase enzymes, which are encoded by the *ttr*, *phs*, and *asr* operons, respectively (4, 56). Interestingly, our unpublished results and previous reports support that the BarA/SirA-CsrB/C-CsrA regulatory cascade controls the expression of the *cbi-cob*, *phs*, and *asr* genes in a similar way to that observed for the *pdu* and *eut* genes (33, 34).

Based on the results described above, it is tempting to speculate that the BarA/SirA-CsrB/C-CsrA regulatory cascade could be involved in the generation of the SPI-1^{ON} and SPI-1^{OFF} subpopulations, which is a matter of our current investigation. Molecules or cues that are present in the intestine, acting through the BarA/SirA TCS and/or other regulatory pathways, could mediate whether the expression of SPI-1 or that of the *pdu/eut/cbi-cob* genes is induced. For instance, the short-chain fatty acids (SCFAs) acetate and formate act through the BarA/SirA TCS to activate SPI-1 gene expression (57–59). Other SCFAs or long-chain fatty acids (LCFAs), such as propionate, butyrate, oleate, myristate, and palmitate, repress the expression of the SPI-1 genes (57, 60–63). It is necessary to know how all of these molecules or signals acting on SPI-1 affect the expression of the *pdu/eut/cbi-cob* genes. This will help to integrate the possible pathways that oppositely control the expression of the SPI-1 and the *pdu/eut/cbi-cob* genes, which could be involved in the generation of the SPI-1^{ON} and SPI-1^{OFF} subpopulations. It should be noted that propanediol, which is the inducer molecule for *pdu* expression, indirectly represses SPI-1 via propionate production from propanediol metabolism (64). Our study adds an additional layer to the complex regulatory network that controls *Salmonella* virulence.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. The cultures for the β -galactosidase and Western blot assays were grown in test tubes containing 5 mL of lysogeny broth (LB)-Miller (1% tryptone, 0.5% yeast agar, and 1% NaCl [pH 7.5]), that were incubated for 16 h at 37°C with shaking at 200 rpm. When necessary, the culture medium was supplemented with streptomycin (100 μ g/mL), ampicillin (200 μ g/mL), or kanamycin (30 μ g/mL).

Construction of mutants and strains expressing 3xFLAG-tagged proteins. Nonpolar gene deletion mutant strains were generated by the λ Red recombinase system, as reported previously (65)

TABLE 1 Bacterial strains and plasmids used in this study^a

Strain or plasmid	Genotype or description	Reference or source
Strain		
<i>S. Typhimurium</i>		
SL1344	<i>xyl, hisG, rpsL, Sm^R</i>	74
JPTM27	Δ <i>sirA</i>	13
DTM134	Δ <i>csrB</i> Δ <i>csrC</i>	51
DTM240	Δ <i>pocR::kan</i>	This study
DTM241	Δ <i>pocR</i>	This study
DTM242	Δ <i>eutR::kan</i>	This study
DTM243	Δ <i>eutR</i>	This study
DTM244	Δ <i>sirA</i> Δ <i>pocR::kan</i>	This study
DTM245	Δ <i>csrB</i> Δ <i>csrC</i> Δ <i>pocR::kan</i>	This study
DTM246	Δ <i>sirA</i> Δ <i>eutR::kan</i>	This study
DTM247	Δ <i>csrB</i> Δ <i>csrC</i> Δ <i>eutR::kan</i>	This study
DTM248	<i>pocR::3XFLAG-kan</i>	This study
DTM249	<i>pocR::3XFLAG</i>	This study
DTM250	<i>eutR::3XFLAG-kan</i>	This study
DTM251	<i>eutR::3XFLAG</i>	This study
<i>E. coli</i> DH10 β	Laboratory strain	Invitrogen
BL21/DE3	Strain for the expression of recombinant proteins	Invitrogen
Plasmids		
pSUB11	pG704 derivative template plasmid for FLAG epitope tagging	66
pKD46	pINT-ts derivative containing a red recombinase system under an arabinose-inducible promoter	65
pCP20	Plasmid expressing FLP recombinase from a temp-inducible promoter, Ap ^R	65
pRS414	pRS415 and pMC1403 derivative plasmid for <i>lacZ</i> translational fusions, Ap ^R	67
ppduA-lacZ	pRS414 derivative containing <i>pduA</i> '-' <i>lacZ</i> translational fusion from nucleotides -618 to +38	Nava-Galeana et al., submitted
peutS-lacZ	pRS414 derivative containing <i>eutS</i> '-' <i>lacZ</i> translational fusion from nucleotides -589 to +89	This study
ppocR-lacZ	pRS414 derivative containing <i>pocR</i> '-' <i>lacZ</i> translational fusion from nucleotides -252 to +68	This study
peutR-lacZ	pRS414 derivative containing P2- <i>eutR</i> '-' <i>lacZ</i> translational fusion from nucleotides -454 to +104	This study
pMPM-K3	p15A derivative low copy number cloning vector, <i>lac</i> promoter, Kan ^R	75
pK3-CsrA	pMPM-K3 derivative expressing CsrA from the <i>lac</i> promoter	13
pK3-SirA	pMPM-K3 derivative expressing SirA from the <i>lac</i> promoter	13
pK3-CsrB	pMPM-K3 derivative expressing CsrB from the <i>lac</i> promoter	13
pMAL-c2x	Vector for constructing maltose binding protein (MBP) fusions, <i>lac</i> promoter, Ap ^R	New England Biolabs
pMAL-PocR	pMAL-c2x derivative expressing MBP-PocR fusion protein, Ap ^R	This study

^aThe coordinates for the *lacZ* translational fusions are relative to the first base of the start codon for each gene. Sm^R, streptomycin resistance; Ap^R, ampicillin resistance; Kan^R, kanamycin resistance.

(Table 1). The *pocR* and *eutR* genes were replaced with a selectable kanamycin resistance cassette in the *S. Typhimurium* SL1344 strain, thereby generating the Δ *pocR::kan* (DTM240) and Δ *eutR::kan* (DTM242) mutants, respectively. The Δ *sirA* Δ *pocR::kan* (DTM244), Δ *csrB* Δ *csrC* Δ *pocR::kan* (DTM245), Δ *sirA* Δ *eutR::kan* (DTM246), and Δ *csrB* Δ *csrC* Δ *eutR::kan* (DTM247) double and triple mutants were generated by introducing the Δ *pocR::kan* (DTM240) or the Δ *eutR::kan* (DTM242) allele into the Δ *sirA* (JPTM27) or Δ *csrB* Δ *csrC* (DTM134) mutants via P22 transduction. The chromosomal *pocR* and *eutR* genes were 3xFLAG-tagged in the *S. Typhimurium* SL1344 strain by using the previously reported λ Red recombinase system (66), thereby generating the *pocR::3XFLAG-kan* (DTM248) and *eutR::3XFLAG-kan* (DTM250) strains, respectively. When required, the kanamycin resistance cassette was excised from the respective mutant strain by using the helper plasmid pCP20 expressing the FLP recombinase, as described previously (65), thereby generating the *S. Typhimurium* Δ *pocR* (DTM241), Δ *eutR* (DTM243), *pocR::3XFLAG* (DTM249), and *eutR::3XFLAG* (DTM251) strains. All of the mutant strains were verified via PCR amplification and sequencing.

Construction of plasmids. The plasmids and primers used in this study are listed in Tables 1 and 2, respectively. To construct the *peutS-lacZ*, *ppocR-lacZ*, and *peutR-lacZ* plasmids, the regulatory regions of *eutS*, *pocR*, and *eutR* were amplified by PCR using the primer pairs *eutS*-FwEcoRI/R2*eutS*-BamHI, *pocR*-FwEcoRI/*pocR*-RvBamHI and F2*eutR*-EcoRI/R2*eutR*-BamHI, respectively. The PCR products were digested with EcoRI and BamHI and were then cloned into the pRS414 vector (67) digested with the same enzymes. To construct the pMAL-PocR plasmid expressing the MBP-PocR fusion protein, the *pocR* structural gene was amplified by PCR using the primers F2PocR-MBP and R2PocR-MBP. The PCR product was digested with BamHI and PstI and was cloned into vector pMAL-c2x digested with the same enzymes. Chromosomal DNA from the WT *S. Typhimurium* SL1344 strain was used as the DNA template in all of the PCRs. All of the plasmids were sequenced and then transformed via electroporation into *S. Typhimurium* genetic backgrounds, as specified.

β -galactosidase assay. The protein quantification and β -galactosidase activity measurements were performed as previously described (68, 69), with the following modifications. Samples of cells were

TABLE 2 Primers used in this work

Primer	Sequence (5'–3') ^{a,b}	Target gene	RE ^c
For <i>lacZ</i> -translational fusions			
eutS-FwEcoRI	CTTGAATTCGAACACGGCGAAGATACAGG	<i>eutS</i>	EcoRI
R2eutS-BamHI	CTTGGATCCGCCAGTTCTTACCAGGGTG	<i>eutS</i>	BamHI
pocR-FwEcoRI	CTTGAATTCGGTAAGAATTTACCTTGAAC	<i>pocR</i>	EcoRI
pocR-RvBamHI	CTTGGATCCGTGGCTTGTGCAAATCCTG	<i>pocR</i>	BamHI
F2eutR-EcoRI	CTTGAATTCGTTTGCTCAGTCATCAAGTGC	<i>eutR</i>	EcoRI
R2eutR-BamHI	CTTGGATCCCGCTGATGAACATTGTCCACC	<i>eutR</i>	BamHI
For gene deletion			
pocR-H1P1	TAAATTAACAGAGGGGTTTTATCATGATTTCTGCGAGCGCTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	<i>pocR</i>	No RE
eutR-H1P1	GCATAGAAGATCATGAAAAAGACCCGTCACGCGAATTTGCACTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	<i>eutR</i>	No RE
For gene FLAG-tagging			
pocR-FLAGFw	TATCGCCAGCAGATAAATGAGAATTTCTATCCTCCATCGTTAGACTACAAAGACCATGACGG	<i>pocR</i>	No RE
pocR-FLAGRv	ACAAAAGACTATCAAAAATCGGCAATAGCAAATATTGCTATCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>pocR</i>	No RE
eutR-FLAGFw	AAACCGTCGTTGACGTGCATCAACGGATGCGGCAATGGGCTGACTACAAAGACCATGACGG	<i>eutR</i>	No RE
eutR-FLAGRv	CACGCGCAGTTATCAGCAACCGGAGAGCCTCCCATCAATACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>eutR</i>	No RE
For gene cloning			
F2PocR-MBP	CTT GGA TCC ATT TCT GCG AGCGCT CTG AAC TC	<i>pocR</i>	BamHI
R2PocR-MBP	CTT CTG CAG GAC TAT CAA AAATCG GCA ATA GC	<i>pocR</i>	PstI
For RNA EMSAs			
T7P <i>pduA</i> For	CTAATACGACTCACTATAGGGTCTTATAGTCCCACTATCGGAACACTCC	<i>pduA</i>	No RE
<i>pduA</i> Rev	CCTTTGGTTTCTACCATTCTAGTGCTTC	<i>pduA</i>	No RE
T7P <i>pocR</i> For	CTAATACGACTCACTATAGGGACTTTTTATCAGGGCCAGGATAATGG	<i>pocR</i>	No RE
<i>pocR</i> Rev	CATGATAAAACCCCTCAGTTAATTTATTGTATAAAC	<i>pocR</i>	No RE
T7P <i>eutS</i> For	CTAATACGACTCACTATAGGGACAAAAAATTGCCACGATGACGGCAG	<i>eutS</i>	No RE
<i>eutS</i> Rev	GACCTGTTTGCCGGCACAAATTCCTGAATAATG	<i>eutS</i>	No RE

^aItalic letters indicate the respective restriction enzyme site in the primer.

^bThe sequences corresponding to the template plasmids pKD4 or pSUB11 are underlined.

^cRE, restriction enzyme for which a site was generated in the primer.

harvested from 1.5 mL of bacterial culture, and they were then centrifuged, washed, resuspended in 800 μ L of DTT buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.8] and 30 μ M DL-dithiothreitol [DTT]), and sonicated on an ice bath for 3 min with periods of 10 s of sonication and 10 s of rest. The sonicated samples were centrifuged, and the supernatant was used for the protein and activity measurements. For the β -galactosidase activity, 20 μ L of each soluble extract was added to a 96-well microplate, and this was followed by the addition of 200 μ L of 0.5 mg/mL o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) resuspended in 1 \times Z buffer (60 mM Na₂HPO₄, 46 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄) pH 7. The rate of each reaction was obtained by recording the change in absorbance at 405 nm every 15 s for 5 min by using an ELx808 scanning microplate reader and the Gen5 software package (BioTek). The activities were obtained via interpolation with a standard curve (0 to 5,400 U) that was previously stored in the Gen5 software. The protein concentration of each cell extract was obtained by using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce). Bovine serum albumin was used as the protein standard. The enzyme activity and protein concentration values were used to calculate the β -galactosidase specific activity (U/mg).

Purification of maltose binding protein (MBP)-PocR. *E. coli* BL21/DE3 carrying the pMAL-PocR was grown in two flasks containing 100 mL of LB with 0.2% glucose at 37°C in a shaken water bath. At an optical density of 0.6, the expression of MBP-PocR was induced by the addition of 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Then, the cultures were incubated overnight at 18°C. Bacterial cells were collected by centrifugation at 8,000 rpm at 4°C. The pellet was washed once with ice-cold column buffer (200 mM Tris-HCl [pH 7.5], 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 10 mM β -mercaptoethanol) and resuspended in 30 mL of the same buffer. The bacterial suspension was sonicated in a Soniprep 150 sonicator (Sonics and Materials, Inc.). Bacterial debris was separated by centrifugation at 4°C, and the soluble extract was loaded three times into an amylose column (New England Biolabs) equilibrated with column buffer. The column was then washed with 13 volumes of column buffer. MBP-PocR was eluted with column buffer containing 10 mM maltose (Sigma). The fractions were analyzed by using SDS-12% polyacrylamide gels, and those containing purified MBP-PocR were concentrated in 1 mL of dialysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8], 40 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, and 20% [vol/vol] glycerol) using an Amicon Ultra 50K device (Merck Millipore) at 5,000 \times g for 20 min. The protein concentration was determined by the Bradford method. Aliquots of the purified proteins were stored at -70° C.

DNA EMSAs. DNA fragments containing the intergenic region upstream of *pduA*, *pocR*, and *eutR* were obtained by PCR amplification with the same primer pairs that were used to construct the respective *lacZ* translational fusions. The resulting DNA fragments were purified with a Zymo DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research). Each PCR product (100 ng) was mixed with increasing concentrations

of purified MBP-PocR in 20 μ L of binding buffer containing 10 mM Tris (pH 8.0), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 5% glycerol, and 10 μ g/mL bovine serum albumin (BSA). The binding reaction mixtures were incubated at room temperature for 20 min, mixed with 2 μ L of 5 \times DNA-loading dye (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol, and 50 \times Gel Red [Biotum]), and then analyzed on 6% nondenaturing Tris-borate-EDTA (TBE)-buffered acrylamide gels in 0.5 \times TBE buffer at 85 V and room temperature. After electrophoresis, the DNA fragments were visualized by UV light illumination (Bio-Rad Molecular Imager, Gel Doc TM, XR+ Imaging System, USA). The MBP-PocR complex was detected by Western blotting.

RNA EMSAs. The electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were performed using published procedures (70). His-tagged CsrA (CsrA-H6) was purified as previously described (71). Note that the sequences of CsrA from *Salmonella* and *E. coli* are identical. RNA was synthesized *in vitro* by using a RNAMaxx Transcription Kit (Agilent Technologies). The PCR fragments that were used as the templates in the transcription reactions contained a T7 promoter and *pocR*, *pduA*, and *eutS* sequences that extended from -91 to $+3$, -44 to $+38$, and -47 to $+48$, relative to the start of the translation, respectively. Gel-purified RNA was 5'-end-labeled with [γ - 32 P]-ATP (7,000 Ci/mmol). RNA suspended in TE buffer was heated to 90°C for 1 min, and this was followed by slow cooling to room temperature. The binding reaction mixtures (10 μ L) contained 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 200 ng/ μ L yeast RNA, 0.2 mg/mL BSA, 7.5% glycerol, 20 mM DTT, 0.1 mg/mL xylene cyanol, 0.2 nM (*eutS* and *pduA*) or 0.1 nM (*pocR*) RNA, and various concentrations of purified CsrA-H6. The competition assay mixtures also contained unlabeled competitor RNA. The reaction mixtures were incubated for 30 min at 37°C to allow for CsrA-RNA complex formation. The samples were then fractionated through native 10% polyacrylamide gels using 0.5 \times TBE buffer. Radioactive RNA bands were visualized with a Typhoon 9410 phosphorimager (GE Healthcare) and quantified using the ImageQuant 5.2 software package. The apparent equilibrium binding constants (K_d) of the CsrA-RNA interaction were calculated as previously described (72).

Western blotting. Western blot assays were conducted as previously described (13), with the following modifications. Briefly, 50 μ g of bacterial soluble extracts were subjected to electrophoresis. Monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma), anti-MBP (Sigma), and polyclonal anti-GroEL (Pierce) antibodies were used at 1:5,000, 1:3,000, and 1:50,000 dilutions, respectively. Horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Pierce) were used at 1:10,000 dilutions.

Statistical analysis. Statistical significance was analyzed by using the Prism 8 program, version 8.01 (GraphPad Software, San Diego, CA), using either one-way analyses of variance (ANOVA) with Tukey's *post hoc* tests or unpaired Student's *t* tests. A *P* value of <0.05 was considered to be indicative of a statistically significant result.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM/México (IN206321) to V.H.B. and from the National Institutes of Health (GM059969 and GM098399) to P.B. J.N.-G. was supported by a predoctoral fellowship from CONACYT (679158).

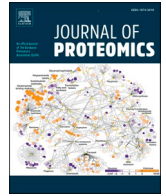
We thank F.J. Santana and M. Fernández-Mora for the technical assistance as well as I. Martínez-Flores for the critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Bäumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, Adams LG. 1998. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* 66:4579–4587. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.10.4579-4587.1998>.
- Fàbrega A, Vila J. 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev* 26:308–341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>.
- dos Santos AMP, Ferrari RG, Conte-Junior CA. 2019. Virulence factors in *Salmonella* Typhimurium: the sagacity of a bacterium. *Curr Microbiol* 76:762–773. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1510-4>.
- Price-Carter M, Tingey J, Bobik TA, Roth JR. 2001. The alternative electron acceptor tetrathionate supports B₁₂-dependent anaerobic growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol. *J Bacteriol* 183:2463–2475. <https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2463-2475.2001>.
- Winter SE, Thiennimitr P, Winter MG, Butler BP, Huseby DL, Crawford RW, Russell JM, Bevins CL, Adams LG, Tsolis RM, Roth JR, Bäumler AJ. 2010. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* 467:426–429. <https://doi.org/10.1038/nature09415>.
- Thiennimitr P, Winter SE, Winter MG, Xavier MN, Tolstikov V, Huseby DL, Sterzenbach T, Tsolis RM, Roth JR, Bäumler AJ. 2011. Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:17480–17485. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107857108>.
- Faber F, Thiennimitr P, Spiga L, Byndloss MX, Litvak Y, Lawhon S, Andrews-Polymeris HL, Winter SE, Bäumler AJ. 2017. Respiration of microbiota-derived 1,2-propanediol drives *Salmonella* expansion during colitis. *PLoS Pathog* 13:e1006129. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006129>.
- Bustamante VH, Martínez LC, Santana FJ, Knodler LA, Steele-Mortimer O, Puente JL. 2008. HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14591–14596. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801205105>.
- Sridhar S, Steele-Mortimer O. 2016. Inherent variability of growth media impacts the ability of *Salmonella* Typhimurium to interact with host cells. *PLoS One* 11:e0157043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157043>.
- Chen P, Ailion M, Bobik T, Stormo G, Roth J. 1995. Five promoters integrate control of the cob/pdu regulon in *Salmonella* typhimurium. *J Bacteriol* 177:5401–5410. <https://doi.org/10.1128/jb.177.19.5401-5410.1995>.
- Roof DM, Roth JR. 1992. Autogenous regulation of ethanolamine utilization by a transcriptional activator of the *eut* operon in *Salmonella* typhimurium. *J Bacteriol* 174:6634–6643. <https://doi.org/10.1128/jb.174.20.6634-6643.1992>.
- Lou L, Zhang P, Piao R, Wang Y. 2019. *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) and its complex regulatory network. *Front Cell Infect Microbiol* 9:270. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00270>.
- Martínez LC, Yakhnin H, Camacho MI, Georgellis D, Babitzke P, Puente JL, Bustamante VH. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07674.x>.

14. Vakulskas CA, Potts AH, Babitzke P, Ahmer BMM, Romeo T. 2015. Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:193–224. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00052-14>.
15. Pourciau C, Lai Y-J, Gorelik M, Babitzke P, Romeo T. 2020. Diverse mechanisms and circuitry for global regulation by the RNA-binding protein CsrA. *Front Microbiol* 11:601352. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.601352>.
16. Martínez LC, Martínez-Flores I, Salgado H, Fernández-Mora M, Medina-Rivera A, Puente JL, Collado-Vides J, Bustamante VH. 2014. *In silico* identification and experimental characterization of regulatory elements controlling the expression of the *Salmonella* *csrB* and *csrC* genes. *J Bacteriol* 196:325–336. <https://doi.org/10.1128/JB.00806-13>.
17. Zere TR, Vakulskas CA, Leng Y, Pannuri A, Potts AH, Dias R, Tang D, Kolaczowski B, Georgellis D, Ahmer BMM, Romeo T. 2015. Genomic targets and features of BarA-UvrY (-SirA) signal transduction systems. *PLoS One* 10:e0145035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145035>.
18. Dubey AK, Baker CS, Romeo T, Babitzke P. 2005. RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA* 11:1579–1587. <https://doi.org/10.1261/ma.2990205>.
19. Mercante J, Edwards AN, Dubey AK, Babitzke P, Romeo T. 2009. Molecular geometry of CsrA (RsmA) binding to RNA and its implications for regulated expression. *J Mol Biol* 392:511–528. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.07.034>.
20. Liu MY, Gui G, Wei B, Preston JF, Oakford L, Yüksel Ü, Giedroc DP, Romeo T. 1997. The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 272:17502–17510. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17502>.
21. Weilbacher T, Suzuki K, Dubey AK, Wang X, Gudapaty S, Morozov I, Baker CS, Georgellis D, Babitzke P, Romeo T. 2003. A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 48:657–670. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03459.x>.
22. Baker CS, Morozov I, Suzuki K, Romeo T, Babitzke P. 2002. CsrA regulates glyco-gen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 44:1599–1610. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02982.x>.
23. Irie Y, Starkey M, Edwards AN, Wozniak DJ, Romeo T, Parsek MR. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. *Mol Microbiol* 78:158–172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07320.x>.
24. Romeo T, Gong M, Liu MY, Brun-Zinkernagel AM. 1993. Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glyco-gen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol* 175:4744–4755. <https://doi.org/10.1128/jb.175.15.4744-4755.1993>.
25. Sabnis NA, Yang H, Romeo T. 1995. Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. *J Biol Chem* 270:29096–29104. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29096>.
26. Yakhnin H, Baker CS, Berezin I, Evangelista MA, Rassin A, Romeo T, Babitzke P. 2011. CsrA represses translation of *sdia*, which encodes the N-acetylhomoserine- γ -lactone receptor of *Escherichia coli*, by binding exclusively within the coding region of *sdia* mRNA. *J Bacteriol* 193:6162–6170. <https://doi.org/10.1128/JB.05975-11>.
27. Pannuri A, Yakhnin H, Vakulskas CA, Edwards AN, Babitzke P, Romeo T. 2012. Translational repression of NhaR, a novel pathway for multi-tier regulation of biofilm circuitry by CsrA. *J Bacteriol* 194:79–89. <https://doi.org/10.1128/JB.06209-11>.
28. Yakhnin AV, Baker CS, Vakulskas CA, Yakhnin H, Berezin I, Romeo T, Babitzke P. 2013. CsrA activates *flhDC* expression by protecting *flhDC* mRNA from RNase E-mediated cleavage. *Mol Microbiol* 87:851–866. <https://doi.org/10.1111/mmi.12136>.
29. Renda A, Poly S, Lai Y, Pannuri A, Yakhnin H, Potts AH, Bevilacqua PC, Romeo T, Babitzke P. 2020. CsrA-mediated translational activation of *ymdA* expression in *Escherichia coli*. *mBio* 11:e00849-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00849-20>.
30. Hung CC, Eade CR, Betteken MI, Pavinski Bitar PD, Handley EM, Nugent SL, Chowdhury R, Altier C. 2019. *Salmonella* invasion is controlled through the secondary structure of the *hilD* transcript. *PLoS Pathog* 15:e1007700. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007700>.
31. Bobik TA, Ailion M, Roth JR. 1992. A single regulatory gene integrates control of vitamin B₁₂ synthesis and propanediol degradation. *J Bacteriol* 174:2253–2266. <https://doi.org/10.1128/jb.174.7.2253-2266.1992>.
32. Kaval KG, Garsin DA. 2018. Ethanolamine utilization in bacteria. *mBio* 9:e00066-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00066-18>.
33. Lawhon SD, Frye JG, Suyemoto M, Porwollik S, McClelland M, Altier C. 2003. Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 48:1633–1645. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03535.x>.
34. Potts AH, Guo Y, Ahmer BMM, Romeo T. 2019. Role of CsrA in stress responses and metabolism important for *Salmonella* virulence revealed by integrated transcriptomics. *PLoS One* 14:e0211430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211430>.
35. Altier C, Suyemoto M, Lawhon SD. 2000. Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion genes by *csrA*. *Infect Immun* 68:6790–6797. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6790-6797.2000>.
36. Roth JR, Lawrence JG, Bobik TA. 1996. Cobalamin (coenzyme B₁₂): synthesis and biological significance. *Annu Rev Microbiol* 50:137–181. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.137>.
37. Sheppard DE, Roth JR. 1994. A rationale for autoinduction of a transcriptional activator: ethanolamine ammonia-lyase (EutBC) and the operon activator (EutR) compete for adenosyl-cobalamin in *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol* 176:1287–1296. <https://doi.org/10.1128/jb.176.5.1287-1296.1994>.
38. Hautefort I, Proença MJ, Hinton JCD. 2003. Single-copy green fluorescent protein gene fusions allow accurate measurement of *Salmonella* gene expression in vitro and during infection of mammalian cells. *Appl Environ Microbiol* 69:7480–7491. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7480-7491.2003>.
39. Ackermann M, Stecher B, Freed NE, Songhet P, Hardt WD, Doebeli M. 2008. Self-destructive cooperation mediated by phenotypic noise. *Nature* 454:987–990. <https://doi.org/10.1038/nature07067>.
40. Sturm A, Heinemann M, Arnoldini M, Benecke A, Ackermann M, Benz M, Dormann J, Hardt WD. 2011. The cost of virulence: retarded growth of *Salmonella* Typhimurium cells expressing type III secretion system 1. *PLoS Pathog* 7:e1002143. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002143>.
41. Diard M, Garcia V, Maier L, Remus-Emsermann MNP, Regoes RR, Ackermann M, Hardt WD. 2013. Stabilization of cooperative virulence by the expression of an avirulent phenotype. *Nature* 494:353–356. <https://doi.org/10.1038/nature11913>.
42. Sánchez-Romero MA, Casadesús J. 2018. Contribution of SPI-1 bistability to *Salmonella enterica* cooperative virulence: insights from single cell analysis. *Sci Rep* 8:14875. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33137-z>.
43. Diard M, Hardt WD. 2017. Basic processes in *Salmonella*-host interactions: within-host evolution and the transmission of the virulent genotype. *Microbiol Spectr* 5:1–11. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MTBP-0012-2016>.
44. Stecher B, Robbiani R, Walker AW, Westendorff AM, Barthel M, Kremer M, Chaffron S, Macpherson AJ, Buer J, Parkhill J, Dougan G, Von Mering C, Hardt WD. 2007. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol* 5:2177–2189. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050244>.
45. Lawley TD, Bouley DM, Hoy YE, Gerke C, Relman DA, Monack DM. 2008. Host transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is controlled by virulence factors and indigenous intestinal microbiota. *Infect Immun* 76:403–416. <https://doi.org/10.1128/IAI.01189-07>.
46. Sonck KAJ, Kint G, Schoofs G, Wauwen CV, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. 2009. The proteome of *Salmonella* Typhimurium grown under in vivo-mimicking conditions. *Proteomics* 9:565–579. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700476>.
47. Sampson EM, Bobik TA. 2008. Microcompartments for B₁₂-dependent 1,2-propanediol degradation provide protection from DNA and cellular damage by a reactive metabolic intermediate. *J Bacteriol* 190:2966–2971. <https://doi.org/10.1128/JB.01925-07>.
48. Ellermeier CD, Ellermeier JR, Slauch JM. 2005. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 57:691–705. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04737.x>.
49. Golubeva YA, Sadik AY, Ellermeier JR, Slauch JM. 2012. Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *Genetics* 190:79–90. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.132779>.
50. Narm K-E, Kalafatis M, Slauch JM. 2020. HilD, HilC, and RtsA form homodimers and heterodimers to regulate expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *J Bacteriol* 202:e00012-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00012-20>.
51. Pérez-Morales D, Nava-Galeana J, Rosales-Reyes R, Teehan P, Yakhnin H, Melchy-Pérez EI, Rosenstein Y, De La Cruz MA, Babitzke P, Bustamante VH. 2021. An incoherent feedforward loop formed by SirA/BarA, HilE and HilD is involved in controlling the growth cost of virulence factor expression by *Salmonella* Typhimurium. *PLoS Pathog* 17:e1009630. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009630>.
52. Roof DM, Roth JR. 1989. Functions required for vitamin B₁₂-dependent ethanolamine utilization in *Salmonella* Typhimurium. *J Bacteriol* 171:3316–3323. <https://doi.org/10.1128/jb.171.6.3316-3323.1989>.
53. Sheppard DE, Penrod JT, Bobik T, Kofoid E, Roth JR. 2004. Evidence that a B₁₂-adenosyl transferase is encoded within the ethanolamine operon of

- Salmonella enterica*. J Bacteriol 186:7635–7644. <https://doi.org/10.1128/JB.186.22.7635-7644.2004>.
54. Jeter RM, Olivera BM, Roth JR. 1984. *Salmonella* Typhimurium synthesizes cobalamin (vitamin B₁₂) de novo under anaerobic growth conditions. J Bacteriol 159:206–213. <https://doi.org/10.1128/jb.159.1.206-213.1984>.
 55. Roth JR, Lawrence JG, Rubenfield M, Kieffer-Higgins S, Church GM. 1993. Characterization of the cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthetic genes of *Salmonella* Typhimurium. J Bacteriol 175:3303–3316. <https://doi.org/10.1128/jb.175.11.3303-3316.1993>.
 56. Hensel M, Hinsley AP, Nikolaus T, Sawers G, Berks BC. 1999. The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella* typhimurium. Mol Microbiol 32:275–287. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01345.x>.
 57. Lawhon SD, Maurer R, Suyemoto M, Altier C. 2002. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella* typhimurium invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. Mol Microbiol 46:1451–1464. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03268.x>.
 58. Chavez RG, Alvarez AF, Romeo T, Georgellis D. 2010. The physiological stimulus for the BarA sensor kinase. J Bacteriol 192:2009–2012. <https://doi.org/10.1128/JB.01685-09>.
 59. Alvarez AF, Rodríguez C, González-Chávez R, Georgellis D. 2021. The *Escherichia coli* two-component signal sensor BarA binds protonated acetate via a conserved hydrophobic-binding pocket. J Biol Chem 297:101383. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101383>.
 60. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, Hinton JCD, Van Immerseel F. 2006. Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. Appl Environ Microbiol 72:946–949. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.946-949.2006>.
 61. Hung CC, Garner CD, Slauch JM, Dwyer ZW, Lawhon SD, Frye JG, McClelland M, Ahmer BMM, Altier C. 2013. The intestinal fatty acid propionate inhibits *Salmonella* invasion through the post-translational control of HilD. Mol Microbiol 87:1045–1060. <https://doi.org/10.1111/mmi.12149>.
 62. Golubeva YA, Ellermeier JR, Chubiz JEC, Slauch JM. 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–e02115. <https://doi.org/10.1128/mBio.02170-15>.
 63. Chowdhury R, Pavinski Bitar PD, Keresztes I, Condo AM, Altier C. 2021. A diffusible signal factor of the intestine dictates *Salmonella* invasion through its direct control of the virulence activator HilD. PLoS Pathog 17:e1009357. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009357>.
 64. Nakayama SI, Watanabe H. 2006. Mechanism of *hilA* repression by 1,2-propanediol consists of two distinct pathways, one dependent on and the other independent of catabolic production of propionate, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J Bacteriol 188:3121–3125. <https://doi.org/10.1128/JB.188.8.3121-3125.2006>.
 65. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A 97:6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>.
 66. Uzzau S, Figueroa-Bossi N, Rubino S, Bossi L. 2001. Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. Proc Natl Acad Sci U S A 98:15264–15269. <https://doi.org/10.1073/pnas.261348198>.
 67. Simons RW, Houman F, Kleckner N. 1987. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. Gene 53:85–96. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90095-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90095-3).
 68. Oropeza R, Sampieri CL, Puente JL, Calva E. 1999. Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. Mol Microbiol 32:243–252. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01329.x>.
 69. Puente JL, Bieber D, Ramer SW, Murray W, Schoolnik GK. 1996. 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>.
 70. Yakhnin H, Yakhnin AV, Baker CS, Sineva E, Berezin I, Romeo T, Babitzke P. 2011. Complex regulation of the global regulatory gene *csrA*: CsrA-mediated translational repression, transcription from five promoters by $E\sigma^{70}$ and $E\sigma^S$, and indirect transcriptional activation by CsrA. Mol Microbiol 81:689–704. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07723.x>.
 71. Mercante J, Suzuki K, Cheng X, Babitzke P, Romeo T. 2006. Comprehensive alanine-scanning mutagenesis of *Escherichia coli* CsrA defines two subdomains of critical functional importance. J Biol Chem 281:31832–31842. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606057200>.
 72. Yakhnin AV, Trimble JJ, Chiaro CR, Babitzke P. 2000. Effects of mutations in the L -tryptophan binding pocket of the trp RNA-binding attenuation protein of *Bacillus subtilis*. J Biol Chem 275:4519–4524. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.4519>.
 73. Garsin DA. 2010. Ethanolamine utilization in bacterial pathogens: roles and regulation. Nat Rev Microbiol 8:290–295. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2334>.
 74. Hoiseth SK, Stocker BAD. 1981. Aromatic-dependent *S. Typhimurium* are non virulent and effective as live vaccines. Nature 291:238–239. <https://doi.org/10.1038/291238a0>.
 75. Mayer MP. 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. Gene 163:41–46. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00389-n](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00389-n).



Proteomic analysis reveals the global effect of the BarA/SirA-Csr regulatory cascade in *Salmonella* Typhimurium grown in conditions that favor the expression of invasion genes

Jessica Nava-Galeana, Cinthia Núñez, Víctor H. Bustamante*

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

ARTICLE INFO

Keywords:
Salmonella
 Proteomics
 SirA
 Csr
 SPI-1

ABSTRACT

In many bacteria, the BarA/SirA and Csr regulatory systems control expression of genes encoding a wide variety of cellular functions. The BarA/SirA two-component system induces the expression of CsrB and CsrC, two small non-coding RNAs that sequester CsrA, a protein that binds to target mRNAs and thus negatively or positively regulates their expression. BarA/SirA and CsrB/C induce expression of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) genes required for *Salmonella* invasion of host cells. To further investigate the regulatory role of the BarA/SirA and Csr systems in *Salmonella*, we performed LC-MS/MS proteomic analysis using the WT *S. Typhimurium* strain and its derived $\Delta sirA$ and $\Delta csrB \Delta csrC$ mutants grown in SPI-1-inducing conditions. The expression of 164 proteins with a wide diversity, or unknown, functions was significantly affected positively or negatively by the absence of SirA and/or CsrB/C. Interestingly, 19 proteins were identified as new targets for SirA-CsrB/C. Our results support that SirA and CsrB/C act in a cascade fashion to regulate gene expression in *S. Typhimurium* in the conditions tested. Notably, our results show that SirA-CsrB/C-CsrA controls expression of proteins required for the replication of *Salmonella* in the intestinal lumen, in an opposite way to its control exerted on the SPI-1 proteins.

Significance: The BarA/SirA and Csr global regulatory systems control a wide range of cellular processes, including the expression of virulence genes. For instance, in *Salmonella*, BarA/SirA and CsrB/C positively regulate expression of the SPI-1 genes, which are required for *Salmonella* invasion to host cells. In this study, by performing a proteomic analysis, we identified 164 proteins whose expression was positively or negatively controlled by SirA and CsrB/C in SPI-1-inducing conditions, including 19 new possible targets of these systems. Our results support the action of SirA and CsrB/C in a cascade fashion to control different cellular processes in *Salmonella*. Interestingly, our data indicate that SirA-CsrB/C-CsrA controls inversely the expression of proteins required for invasion of the intestinal epithelium and for replication in the intestinal lumen, which suggests a role for this regulatory cascade as a molecular switch for *Salmonella* virulence. Thus, our study further expands the insight into the regulatory mechanisms governing the virulence and physiology of an important pathogen.

1. Introduction

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) is a Gram-negative facultative pathogenic bacterium that causes self-limiting gastrointestinal diseases in both humans and animals, but it can also cause systemic infections depending on the host susceptibility [1–3]. Horizontal gene transfer events have shaped *Salmonella* pathogenicity evolution; most of its virulence genes are encoded in *Salmonella* Pathogenicity Islands (SPIs) [1,4,5]. A Type III Secretion System (T3SS-1) and its effector proteins, encoded in SPI-1, are important for invasion

and triggering an inflammatory response in the intestinal epithelium, leading to gastrointestinal disease [6,7]. The AraC-like transcriptional regulator HilD is at the top of a complex regulatory network controlling the expression of the SPI-1 genes and many other virulence genes located outside SPI-1 [8–10]. Expression of SPI-1 is induced when *Salmonella* is in the host gut, as well as under laboratory conditions during the stationary phase of growth in rich media, such as the lysogeny broth (LB) [11,12]. Many regulators and signaling molecules controlling the expression of SPI-1 converge on HilD [8,13,14].

CsrA is an RNA-binding protein that negatively regulates SPI-1 by

* Corresponding author.

E-mail address: victor.bustamante@ibt.unam.mx (V.H. Bustamante).

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2023.104960>

Received 29 March 2023; Accepted 27 June 2023

Available online 13 July 2023

1874-3919/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

binding near the Shine-Dalgarno motif and the translational initiation codon of *hilD*, thereby repressing its expression [15,16]. The BarA/SirA two-component regulatory system activates the expression of *HilD* by inducing the expression of the CsrB and CsrC (CsrB/C) small RNAs (sRNAs), which bind CsrA and thus counteract the CsrA-mediated translational repression on the *hilD* transcript [17,18]. Orthologs of the BarA/SirA, CsrB/C, and CsrA are present in many bacteria, where they control the expression of numerous genes for different biological processes [18,19]. CsrA binds to a GGA motif generally found within the loops of hairpin structures formed in its target mRNA [20,21]; CsrA binding modifies this RNA structure leading to translational repression or activation, RNA stabilization or destabilization, as well as to transcriptional termination [18,19]. CsrB and CsrC sRNAs carry 18 and 9 CsrA-binding motifs, respectively, and thus, when present sequester CsrA and release its effect on target transcripts [18,22,23]. In *Salmonella* and *Escherichia coli*, the BarA/SirA (BarA/UvrY) two-component system induces the expression of CsrB/C and target genes in response to the presence of short-chain fatty acids such as formate and acetate [24–27].

To further investigate the role of the BarA/SirA and CsrB/C systems in the virulence and physiology of *Salmonella*, we performed label-free LC-MS/MS proteomics on the WT *S. Typhimurium* SL1344 strain and its isogenic $\Delta sirA$ and $\Delta csrB \Delta csrC$ mutants grown in LB at early stationary phase, conditions that favor SPI-1 expression. We found 164 proteins that were affected by the absence of SirA and/or CsrB/C, including 19 new possible targets of these regulators; many of these proteins are involved in different biological processes, while others are of unknown function. We found that SirA-CsrB/C negatively regulates expression of the *pdu* and *cbi-cob* genes, which favor replication of *Salmonella* in the lumen of inflamed gut [28,29]. Additionally, as reported previously [15], we observed that SirA-CsrB/C positively regulates

expression of SPI-1 genes. Furthermore, our results support that SirA and CsrB/C act in a cascade fashion to regulate gene expression in *Salmonella* in the conditions tested.

2. Results

2.1. Proteins under the control of SirA and CsrB/C

To gain insights into the role of the BarA/SirA and Csr systems in the virulence and physiology of *S. Typhimurium*, we performed LC-MS/MS label-free proteomics in conditions that induce the expression of SPI-1 virulence genes (SPI-1-inducing conditions). The WT *S. Typhimurium* SL1344 strain and its derived $\Delta sirA$ or $\Delta csrB \Delta csrC$ mutants, grown in LB at 37 °C, were tested. The effect of CsrA was not analyzed because the absence of this regulator generates a severe growth defect in *S. Typhimurium* [15,30]. A total of 1268 different proteins were detected among the WT strain and the $\Delta sirA$ and $\Delta csrB \Delta csrC$ mutants (Table S1). The expression of 164 proteins was affected in the $\Delta sirA$ or $\Delta csrB \Delta csrC$ mutants, or in both, with respect to the WT strain, considering a fold change ≥ 2 or ≤ 0.5 and a statistical significance with a *P* value ≤ 0.05 (Fig. 1A and B; Table S2). Among these 164 proteins, 83 were downregulated and 81 were upregulated (Fig. 1C; Table S2). We used the NCBI, Uniprot, and KEGG databases to know or predict the function of the proteins that were affected in the $\Delta sirA$ and $\Delta csrB \Delta csrC$ mutants. This analysis indicated that SirA and CsrB/C regulate diverse biological processes in *Salmonella*, such as metabolism, motility, stress response, and virulence (Fig. 2; Table S2–6). In agreement with previous studies [15,31–33], our proteomic analysis indicates that SirA and CsrB/C regulate positively SPI-1 genes and negatively flagellar genes (Fig. 2; Table S2–6), both required for virulence. Furthermore, also consistent

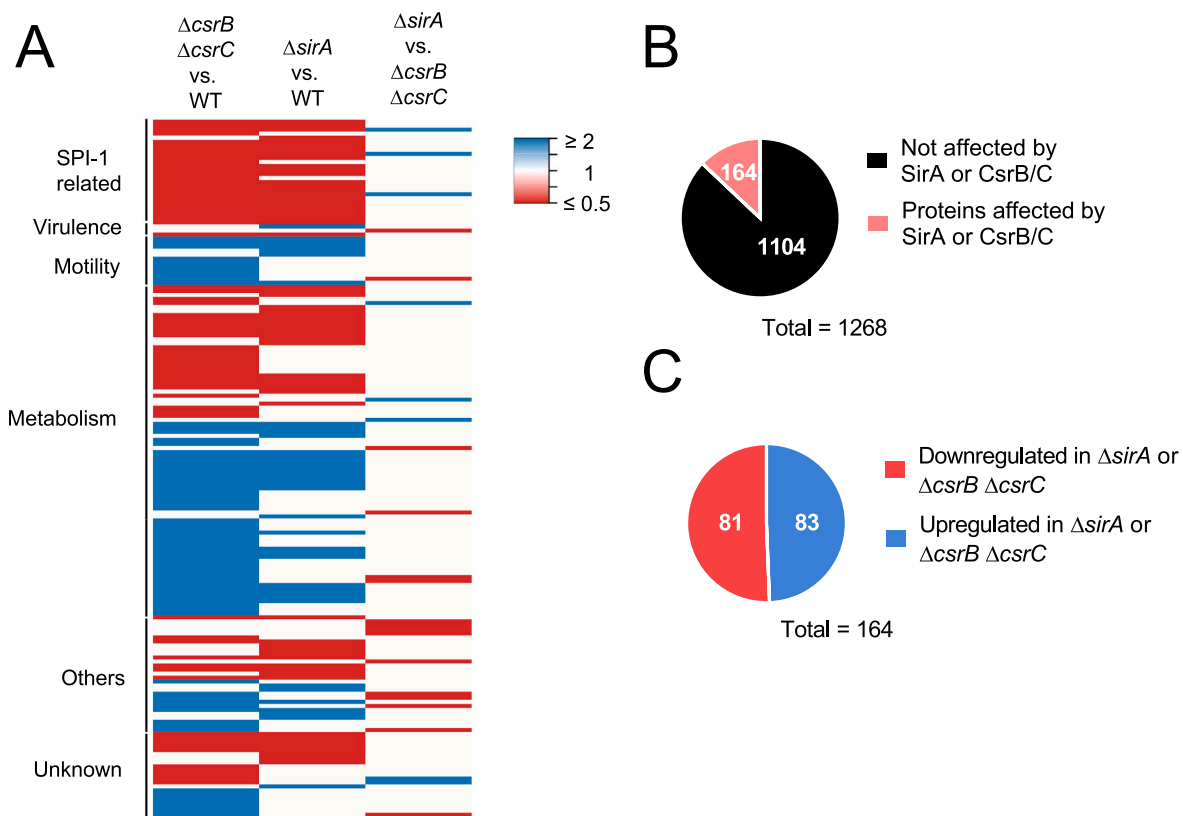


Fig. 1. Proteins differentially expressed in the LC-MS/MS proteomic analysis. (A) Heatmap of differentially expressed proteins in the $\Delta csrB \Delta csrC$ or $\Delta sirA$ mutants with respect to WT strain, or in the $\Delta sirA$ mutant with respect to the $\Delta csrB \Delta csrC$ mutant. This figure was created with Heatmapper [77]. (B) Number of proteins differentially expressed in the $\Delta csrB \Delta csrC$ or $\Delta sirA$ mutants with respect to the WT strain. (C) Number of proteins downregulated and upregulated in the $\Delta csrB \Delta csrC$ or $\Delta sirA$ mutants with respect to the WT strain.

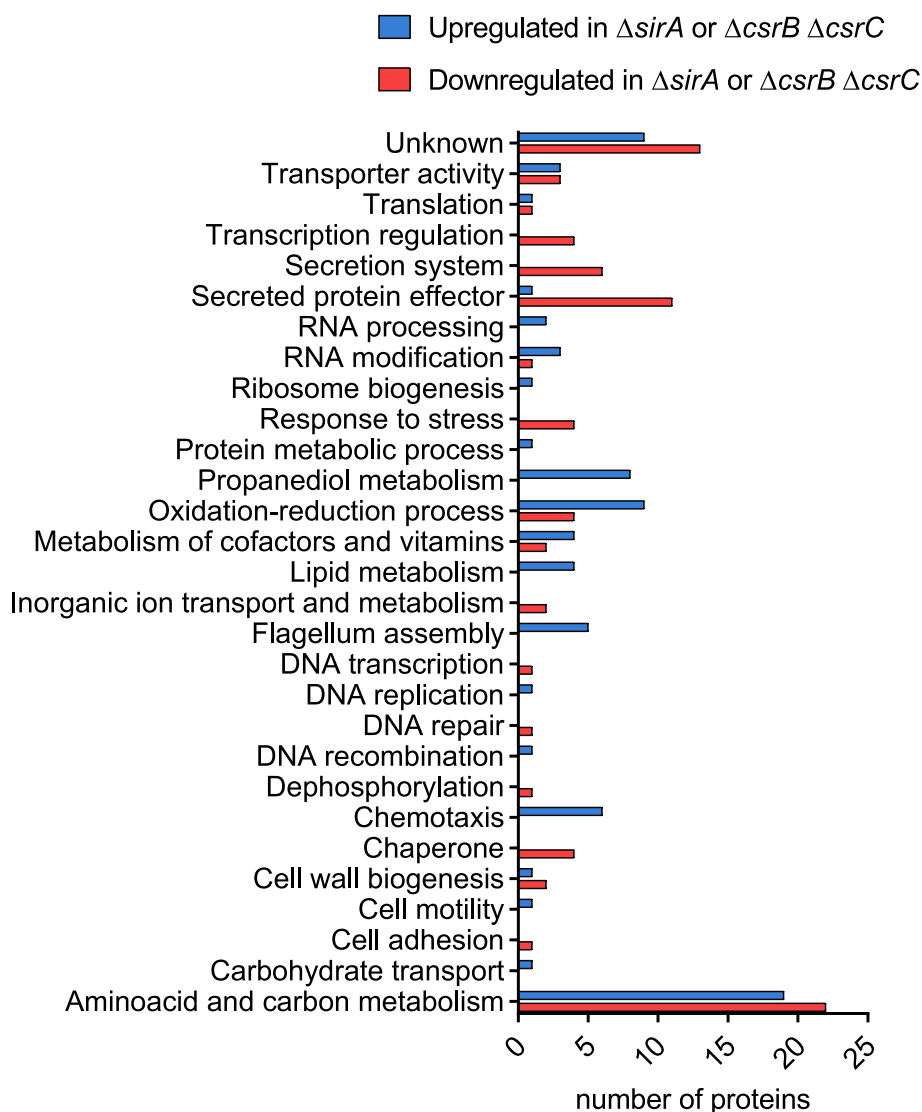


Fig. 2. Biological processes of the proteins controlled by SirA and CsrB/C. The graphic shows functional categories of downregulated and upregulated proteins in the $\Delta csrB \Delta csrC$ or $\Delta sirA$ mutants with respect to the WT strain obtained with NCBI, Uniprot, KEGG, and STRING databases.

with previous reports [34,35], our proteomic analysis indicates that SirA and CsrB/C positively regulate the *glgC* and *glgB* genes (Fig. 2; Table S2–6), which are necessary for glycogen biosynthesis.

Our results support that SirA-CsrB/C regulates the expression of 22 proteins of unknown function: SL1780, SL3653, YbaY, YebF, YjbJ, YdeJ, YdeI, YhcH, YdcJ, YchN, YgiW, ElaA, YdiH, Ygfb, YifE, YcgL, SL1061, YhcB, YegQ, SL1969, SLP2_0011, and YqcC (Fig. 2; Table S2). SL1061 and SLP2_0011 do not have *E. coli* orthologs, suggesting that the genes encoding these proteins were acquired by *S. Typhimurium* and then incorporated into the regulons of SirA and CsrB/C. The referred 22 putative proteins might be involved in any of the biological processes controlled by SirA and CsrB/C.

Our proteomic analysis identified 145 proteins that were previously linked to the BarA/SirA (UvrY) and Csr systems for either *Salmonella* or *E. coli* (Table S2) [36–47]. Interestingly, we found 19 proteins as new targets for the SirA and CsrB/C systems: Tgt, SL1061, YdgJ, SL1488, SrfB, DhaB, PduP, PduQ, PduS, YegQ, SL2374, AsrB, AsrC, YrbD, SL4396, SL4470, SLP1_0061, SLP2_0011, and SogL (Table S2).

Thus, our results show the regulons for SirA and CsrB/C under growth conditions relevant for *S. Typhimurium* virulence and reveal new members of these regulons.

2.2. SirA acts through CsrB/C

Most studies indicate that SirA and CsrB/C (or the respective orthologs) act together in a cascade fashion [19,48]; SirA directly activates the expression of the *csrB* and *csrC* genes [17,32,49]. However, some studies have reported the binding of SirA to genes other than *csrB* and *csrC*, as well as the effect of SirA independent of CsrB/C [32,44,50]. When compared with data from the WT strain, the proteomic profiles between the $\Delta sirA$ and the $\Delta csrB \Delta csrC$ mutants are very similar (Fig. 1A). These results support that SirA and CsrB/C act mainly in a cascade fashion in the conditions tested. To better analyze this phenomenon, we directly compared the proteomic profiles between the $\Delta sirA$ and $\Delta csrB \Delta csrC$ mutants. A total of 25 proteins were found differentially expressed (Fig. 1A and Table S7), which could suggest an independent action of SirA and CsrB/C on these 25 proteins in the conditions tested. To note, one of these 25 proteins is SirA, which, as expected, was not detected in the $\Delta sirA$ mutant. To further explore whether SirA and CsrB/C could exert a regulatory effect independent of each other, expression of selected proteins was analyzed by *lacZ* translational fusions. Analysis of the Normalized Spectral Abundance Factor (NSAF) from the proteomic data for the referred 25 proteins showed four different expression profiles: 1) the expression level was higher in the

$\Delta csrB \Delta csrC$ mutant than in the $\Delta sirA$ mutant and the WT strain, shown by 11 cases (Fig. S1A); 2) the expression level was lower in the $\Delta csrB \Delta csrC$ mutant than in the $\Delta sirA$ mutant and the WT strain, shown by 5 cases (Fig. S1B); 3) the expression level was lower in the $\Delta sirA$ mutant than in the $\Delta csrB \Delta csrC$ mutant and the WT strain, shown by 5 cases (Fig. S1C); 4) the expression level was decreased in both the $\Delta sirA$ and $\Delta csrB \Delta csrC$ mutants, compared to the WT strain, but to a lower extent in the $\Delta csrB \Delta csrC$ mutant, shown by 3 SPI-1 related proteins (Fig. S1D). We chose to analyze by *lacZ* translational fusions the expression of proteins YqcC, CbiP, and RepA2, as representatives of the expression profiles one, two, and three, respectively. The expression profile four was not analyzed since it is well known that SirA and CsrB/C act in cascade on *hilD* to regulate SPI-1 and related proteins [15,16,38]. As a control, expression of *HilD* and *YebF* was also assessed since their NSAF proteomic profile agreed with their regulation by the SirA-CsrB/C cascade, that is, a similar decrease of expression in both the $\Delta csrB \Delta csrC$ and $\Delta sirA$ mutants with respect to the WT strain (Fig. S2).

Expression of the *yqcC-lacZ* fusion was significantly increased in the $\Delta csrB \Delta csrC$ and $\Delta sirA$ mutants compared to the WT strain, slightly more in the $\Delta csrB \Delta csrC$ mutant than in the $\Delta sirA$ mutant (statistically not significant); the pK3-CsrA plasmid expressing CsrA significantly increased its expression in the WT strain (Fig. 3A). These results indicate that the expression of the *yqcC* gene is positively modulated by CsrA and negatively by SirA and CsrB/C.

We used the *cbiA-lacZ* fusion to monitor the expression of the CbiP protein; *cbiA* is the first gene of a large operon containing *cbiP* [51,52]. Expression of the *cbiA-lacZ* fusion was significantly increased in the $\Delta csrB \Delta csrC$ and $\Delta sirA$ mutants compared with the WT strain; the pK3-CsrA plasmid significantly increased its expression in the WT strain (Fig. 3B). These results support that the expression of the *cbi-cob* operon is positively modulated by CsrA and negatively by SirA and CsrB/C.

Expression of the *repA2-lacZ* fusion was not significantly affected in the $\Delta csrB \Delta csrC$ and $\Delta sirA$ mutants, but it was significantly decreased by the pK3-CsrA plasmid in the WT strain (Fig. 3C). These results could indicate that at WT levels of CsrA, the *repA2* gene is not controlled by SirA and CsrB/C.

Expression of the *yebF-lacZ* fusion and, as expected, that of the *hilD-lacZ* fusion, were significantly reduced in the $\Delta csrB \Delta csrC$ and $\Delta sirA$ mutants; the pK3-CsrA plasmid drastically reduced their expression in the WT strain (Fig. 3D and E). These results show that the expression of both the *yebF* and *hilD* genes is controlled negatively by CsrA and positively by SirA and CsrB/C.

Together, our results support that under the conditions tested SirA and CsrB/C conform a regulatory cascade to regulate gene expression in *Salmonella*. Some differences observed between the proteomic profiles of SirA and CsrB/C can be attributable to the basal expression of CsrB/C in the absence of SirA [17,49,53], which could partially counteract the action of CsrA on some target genes or can be due to technical variations

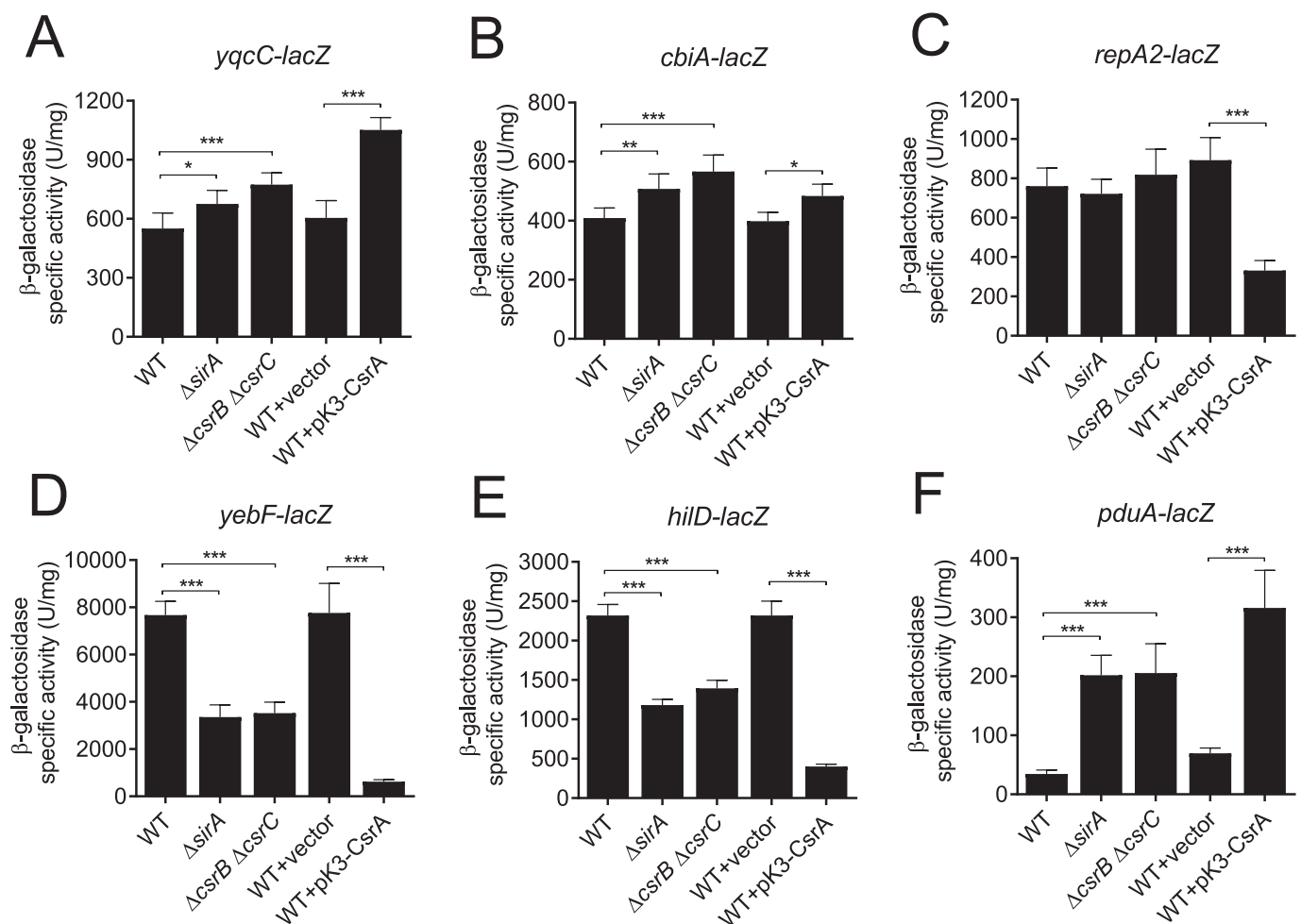


Fig. 3. Effect of SirA and CsrB/C on the expression of *lacZ* translational fusions of selected genes. Expression of the *yqcC-lacZ* (A), *cbiA-lacZ* (B), *repA2-lacZ* (C), *yebF-lacZ* (D), *hilD-lacZ* (E), and *pduA-lacZ* (F) translational fusions, was determined in the WT *S. Typhimurium* strain and in its derivative $\Delta sirA$ and $\Delta csrB \Delta csrC$ mutants, as well as, in the WT strain containing the pMPM-K3 vector or the pK3-CsrA plasmid. β -galactosidase specific activity was determined from samples of bacterial cultures grown overnight in LB at 37 °C. Bars indicate the mean and standard deviations of three independent experiments performed in duplicate. *P*-value was calculated using one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

of the global expression analysis.

2.3. BarA/SirA and CsrB/C systems oppositely regulate the expression of genes for intestinal invasion and luminal replication

Results from our proteomic analysis show positive regulation of SirA and/or CsrB/C on 26 SPI-1 or related proteins (Fig. 4A and Table S2). Interestingly, these results also show negative regulation of SirA and/or CsrB/C on several proteins involved in the replication of *Salmonella* in the intestinal lumen, including PduA, DhaB (PduC), PduD, PduE, PduP, PduQ, and PduS (Fig. 4A and Table S2), which are encoded in the *pdu* operon [54]. To confirm this latter finding, we analyzed the expression of the *pdu* operon by a *lacZ* translational fusion. Expression of the *pduA-lacZ* fusion was significantly increased in the $\Delta csrB \Delta csrC$ and $\Delta sirA$ mutants compared to the WT strain; the pK3-CsrA plasmid significantly increased its expression in the WT strain (Fig. 3F). Additional proteins involved in the luminal replication of *Salmonella* whose expression was negatively affected by SirA and CsrB/C in our proteomic analysis are CbiC and CbiP. The negative regulation of these proteins by SirA and CsrB/C was confirmed by assessing the *cbiA-lacZ* translational fusion (Fig. 3B).

Collectively, our results indicate that the SirA-CsrB/C-CsrA regulatory cascade controls in an opposite way the expression of genes required for invasion of the intestinal epithelium (SPI-1 and related genes) and for replication in the intestinal lumen (*pdu* and *cbi-cob* genes) (Fig. 4B).

3. Discussion

The BarA/SirA-CsrB/C-CsrA regulatory cascade controls different cellular processes in numerous bacteria [18,19]. In this study, a proteomic approach was undertaken to determine the global regulatory effect of SirA and CsrB/C in *S. Typhimurium* grown under conditions that

favor the expression of genes mediating intestinal colonization. It is worth noting that the global role of CsrB/C had not been previously analyzed in *Salmonella*. We detected 164 proteins whose expression is controlled by SirA and/or CsrB/C in the conditions tested, which were associated with different biological pathways. Previous studies have connected 145 of these 164 proteins to the BarA/SirA and Csr systems [36–47]. Importantly, our study also revealed 19 proteins that to our knowledge represent new targets for SirA and CsrB/C. *S. Typhimurium* and *E. coli* K12 share only 4 of these 19 proteins: YdgJ, Tgt, YegQ (TrhP), and YrbD (MlaD). YdgJ is a putative oxidoreductase of unknown function, Tgt is a tRNA-guanine transglycosylase that modifies tRNA molecules [55], YegQ (TrhP) is a U32 family peptidase responsible for tRNA hydroxylation [56], and YrbD (MlaD) is a subunit of the MlaFEDB ABC-transporter complex that maintains lipid asymmetry [57]. Interestingly, 15 of the 19 referred proteins are present in *S. Typhimurium* but not in *E. coli* K12, suggesting that the corresponding genes were acquired by *S. Typhimurium* and then incorporated into the control of the ancestral regulatory systems SirA and CsrB/C. These 15 proteins are SL1061, SL1488, SrfB, DhaB, PduP, PduQ, PduS, SL2374, AsrB, AsrC, SL4396, SL4470, SLP1_0061, SLP2_0011, and SogL. The DhaB (PduC), PduP, PduQ, PduS, AsrB, and AsrC proteins are required for the luminal replication of *Salmonella* in the inflamed gut [28,29,58–60]. SrfB is a protein of unknown function regulated by the SPI-2 master regulator SsrA/B [61]. SL4470 is a hypothetical sugar isomerase encoded within the putative operon *SL4466-SL4471*; SLP1_0061 is a putative carbonic anhydrase encoded within pSLT plasmid; SLP2_0011 (YagA) and SogL are encoded within pCol1B9 plasmid, the former is a hypothetical protein of unknown function, while the latter is a DNA primase; the SL4470, SLP1_0061, SLP2_0011 (YagA), and SogL proteins are required for the intestinal colonization of animals [62]. SL1488 is a glycogen debranching protein with 48% identity with GlgX; SL4396 is a carboxylate kinase with 55% identity with ArcC involved in metabolism of amino acids; SL1061 is a hypothetical secreted protein, and SL2374 is a

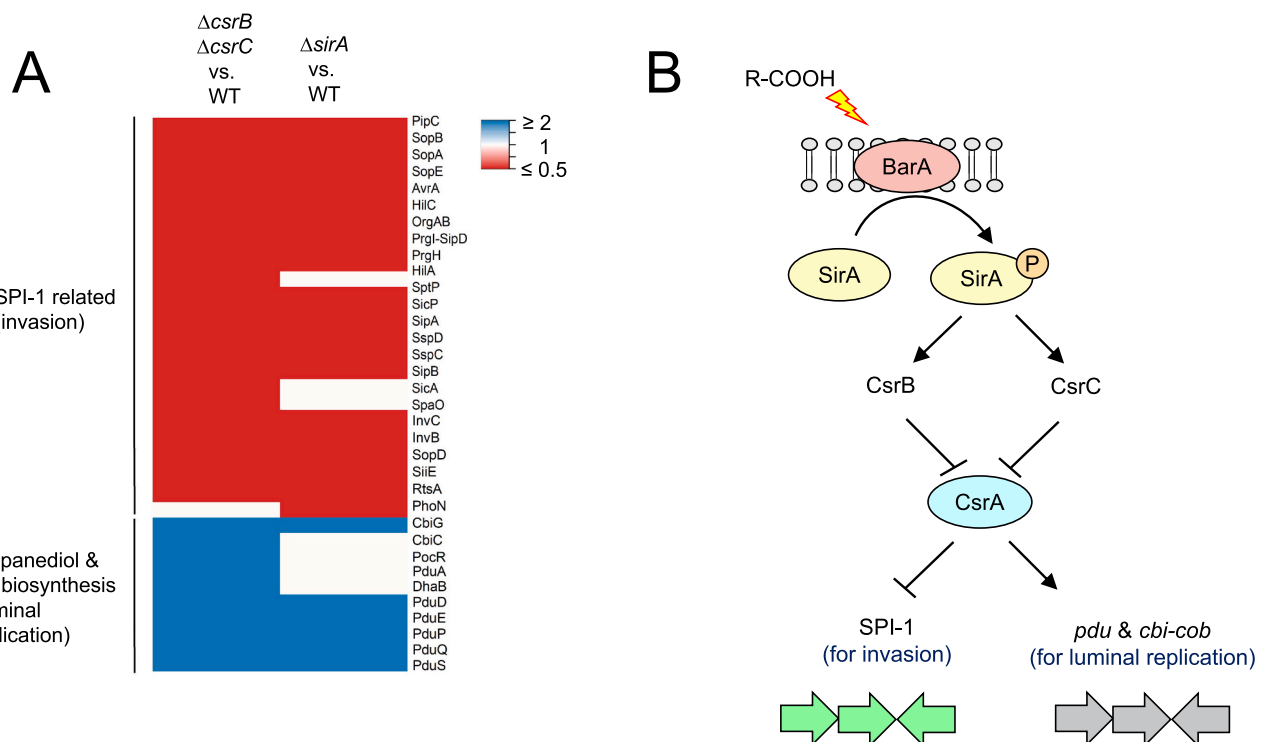


Fig. 4. The BarA/SirA and Csr systems oppositely regulate SPI-1 genes and proteins encoded in the *pdu* and *cbi-cob* operons whose expression was affected in the $\Delta csrB \Delta csrC$ or $\Delta sirA$ mutants with respect to the WT strain. This figure was created with Heatmapper [77]. (B) Model for the opposite regulation mediated by BarA/SirA and Csr on genes for invasion (SPI-1) and for luminal replication (*pdu* and *cbi-cob*).

hypothetical ion-channel protein. The putative or known functions of these proteins are consistent with biological processes regulated by the BarA/SirA and Csr systems [19].

Our results indicate that SirA and CsrB/C act in a cascade fashion to regulate gene expression in *Salmonella*, which is also supported by previous global expression studies performed in *Salmonella* and *E. coli* [36–47]. However, the binding of SirA to some genes other than *csrB* and *csrC* has been reported [32,44,50]. Thus, the action of SirA independently of CsrB/C cannot be discarded, especially under conditions other than those tested in this study.

Notably, our results show that SirA and CsrB/C regulate positively the expression of SPI-1 and related genes, and negatively the expression of genes for the replication of *Salmonella* in the intestinal lumen, such as the *pdu* and *cbi-cob* genes. Previous global expression studies support these findings [38,45,46]. In the intestine, as well as in *in vitro* SPI-1-inducing conditions, like those assessed in this study, *Salmonella* differentiates in two genetically identical but phenotypically different subpopulations that cooperate for successful intestinal colonization [63–66]. One expresses the SPI-1 genes (SPI-1^{ON}), and the other does not (SPI-1^{OFF}), which indicates a bistable expression of SPI-1 [67,68]. The SPI-1^{ON} population invades cells from the intestinal epithelium and induces an intestinal inflammatory response, which generates electron acceptors (such as tetrathionate) that are used for the SPI-1^{OFF} population for replication in the intestinal lumen, using propanediol and ethanolamine as carbon sources [28,29,59,60]. It is tempting to speculate that, by oppositely controlling expression of the SPI-1 genes and that of the *pdu* and *cbi-cob* genes, the BarA/SirA-CsrB/C-CsrA regulatory cascade could be involved in the generation of the two populations of *Salmonella* that cooperate for the intestinal colonization. The presence in the intestine of small molecules that can modulate the activity of BarA/SirA-CsrB/C, such as short-chain fatty acids [24–27], would determine the expression of ones or other genes controlled by this regulatory cascade.

Our study further expands the knowledge about the regulatory role of the BarA/SirA and Csr systems in the pathogenic bacterium *Salmonella*. Particularly relevant was the identification of novel targets for SirA and CsrB/C and the observation that these regulators could be involved in the generation of two populations of *Salmonella* that cooperate for virulence.

4. Material and methods

4.1. Culture conditions

Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. Bacterial cultures were grown overnight at 37° in LB (1% tryptone, 0.5% yeast agar, and 1% NaCl, at pH 7.5); when necessary, LB was supplemented with antibiotics streptomycin (100 µg/ml), ampicillin (200 µg/ml) or kanamycin (30 µg/ml). Overnight cultures were diluted 1:100 in 50 ml of fresh LB in 250 ml flasks and incubated at 37 °C in a shaking water bath at 200 rpm (Gyromax 902; Amerex Instruments). For the proteomic analysis, samples were taken of bacterial cultures grown for 5 h (OD₆₀₀, of 1.4). To determine β-galactosidase activity, samples were taken from overnight cultures.

4.2. Sample preparation for LC-MS/MS analysis

Cells were harvested by centrifugation at 4000 rpm for 8 min at 4 °C, washed, and resuspended in cold 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.4. The resuspended bacterial pellet was sonicated in an ice bath until it was clear. Unbroken cells and debris were eliminated by ultracentrifugation at 40,000 rpm for 1 h at 4 °C. The supernatant produced was used as the soluble fraction, and protein concentration was determined by Bradford. 20 µg of protein were precipitated overnight with cold acetone (Sigma) at –20 °C. The protein samples were collected by centrifugation at 13,000 rpm for 30 min. Protein extracts were solubilized in 10 µl of 6

Table 1

Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Genotype or description	Reference or source
Strain		
<i>Salmonella</i> Typhimurium		
SL1344	<i>xyI</i> , <i>hisG</i> , <i>rpsL</i> , Sm ^R	[78]
JPTM27	Δ <i>sirA</i>	[15]
DTM134	Δ <i>csrB</i> Δ <i>csrC</i>	[79]
<i>Escherichia coli</i>		
DH10β	Laboratory strain	Invitrogen
Plasmids		
pRS414	pRS415 and pMC1403 derivative plasmid for <i>lacZ</i> translational fusions; Ap ^R	[74]
pyqC- <i>lacZ</i>	pRS414 derivative containing <i>yqC-lacZ</i> translational fusion from nucleotides –183 to +32	This study
prepA2- <i>lacZ</i>	pRS414 derivative containing <i>repA2-lacZ</i> translational fusion from nucleotides –598 to +62	This study
pcbIA- <i>lacZ</i>	pRS414 derivative containing <i>cbiA-lacZ</i> translational fusion from nucleotides –616 to +50	This study
pyebF- <i>lacZ</i>	pRS414 derivative containing <i>yebF-lacZ</i> translational fusion from nucleotides –104 to +32	This study
philD- <i>lacZ</i>	pRS414 derivative containing <i>hilD-lacZ</i> translational fusion from nucleotides –444 to +121	This study
ppduA- <i>lacZ</i>	pRS414 derivative containing <i>pduA-lacZ</i> translational fusion from nucleotides –618 to +38	This study
pMPM-K3	p15A derivative low-copy-number cloning vector, <i>lac</i> promoter, Kan ^R	[80]
pK3-CsrA	pMPM-K3 derivative expressing CsrA from the <i>lac</i> promoter	[15]

The coordinates for the *lacZ* translational fusions are relative to the first base of the start codon for each gene. Sm^R, streptomycin resistance; Ap^R, ampicillin resistance; Kan^R, kanamycin resistance.

M urea buffer. Then, proteins were reduced by adding 2.5 µl of reduction buffer (45 mM DTT and 100 mM NH₄HCO₃), incubated for 30 min at 37 °C, then alkylated by adding 2.5 µl of alkylation buffer (100 mM iodoacetamide and 100 mM NH₄HCO₃) and incubated for 20 min at 24 °C in dark. The urea concentration was reduced to 2 M with 20 µl of water. Next, 10 µl of the trypsin solution (5 ng/µl of trypsin sequencing grade, Promega) and 50 mM NH₄HCO₃ were added to each sample. Protein digestion was performed for 18 h at 37 °C and then stopped with 5 µl of 5% formic acid. Protein digests were dried down in a vacuum centrifuge and stored at –20 °C until LC-MS/MS analysis.

4.3. LC-MS/MS analysis

LC-MS/MS was performed at the IRCM-Proteomics Discovery Platform of the Montreal Clinical Research Institute. Before LC-MS/MS, protein digests were re-solubilized in 10 µl of 0.2% formic acid under agitation for 15 min. Cleanup of the digests was performed by C18 ZipTip pipette tips (Millipore, Billerica, MA). Elutes were dried down in a vacuum centrifuge and then re-solubilized in 10 µl of 2% acetonitrile/1% formic acid under agitation for 15 min. The LC column was a PicoFrit fused silica capillary column 15 cm × 75 µm (New Objective, Woburn, MA), self-packed with C-18 reverse-phase material Jupiter 5 µm particles, 300 Å pore size (Phenomenex, Torrance, CA), using a high-pressure packing cell. This column was installed on the Easy-nLC II system (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) and coupled to the Orbitrap Q Exactive (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany), equipped with a Proxeon nanoelectrospray Flex ion source. The buffers used were 0.2% formic acid (buffer A) and 100% acetonitrile/0.2% formic acid (buffer B). Peptides were loaded at a flow rate of 600 nL/min and then eluted

with a 2-slope gradient, at a flow rate of 250 nL/min. Solvent B increased from 2 to 40% in 82 min and then from 40 to 80% B in 28 min. LC-MS/MS data were acquired using a data-dependent top16 method, combined with a dynamic exclusion window of 7 s. The mass resolution for MS was set to 60,000 (at m/z 400), and lock masses were used to improve mass accuracy. Mass over charge ratio range was from 360 to 2000 for MS scanning with a target value of 1,000,000 charges, the maximum ion fill time (IT) at 100 ms, the intensity threshold at 10,000, and the underfill ratio at 0.5%. Data-dependent MS2 scan events were acquired at a resolution of 17,500 with the maximum ion fill time at 50 ms and the target value at 100,000. Nanospray and S-lens voltages were set to 1.3–1.7 kV and 50 V, respectively. The normalized collision energy used was 27 V and the capillary temperature was 250 °C.

4.4. Quantification of the identified proteins

The protein identification was carried out using the NCBI database against *S. Typhimurium* SL1344 (txid 216,597, 9610 entries), and analyzed with Mascot 2.5.1 (Matrix Science, London, UK), assuming the digestion enzyme trypsin. Mascot was searched with a fragment ion mass tolerance of 0.6 Da and for precursor ions tolerance of 10 ppm. O⁺¹⁸ of pyrrolysine and carbamidomethyl of cysteine were specified in Mascot as fixed modifications. Oxidation of methionine was specified in Mascot as a variable modification. Scaffold v4.7.2 (Proteome Software Inc., Portland, OR) [69] was used to validate MS/MS based peptide and protein identification. Peptide identification was accepted if they could establish a > 95% probability as specified by the Peptide Prophet algorithm [70]. Protein identification was accepted if they could establish a > 99% probability according to the Protein Prophet algorithm [71] and had at least 2 peptides. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. The label-free quantitative analysis was performed by the spectral counting method and then analyzed by the normalized spectral abundance factor (NSAF) [72,73]. We performed an unpaired *t*-test analysis (with 3 different biological replicates); protein ratios that differed more than two-fold and had a $p \leq 0.05$ were considered to be significant.

4.5. Construction of plasmids

Plasmids and primers used in this study are listed in Tables 1 and 2, respectively. To construct the *yqcC-lacZ*, *pcbiA-lacZ*, *prepA2-lacZ*, *pyebF-lacZ*, *phlID-lacZ*, and *ppduA-lacZ* plasmids, the regulatory regions of *yqcC*, *cbiA*, *repA2*, *yebF*, *hilD*, and *pduA*, were amplified by PCR with the primer pairs *yqcCB-FwEcoRI/yqcCB-RvBamHI*, *cbiAP-FwEcoRI/cbiAP-RvBamHI*, *repA-FwEcoRI/R3-repA-BamHI*, *yebF-FwEcoRI/yebF-RvBamHI*, *hilDF-EcoRI/hilDR-BamHI*, and *pduA-FwEcoRI/R2pduA-BamHI*, respectively, using chromosomal DNA from the WT *S.*

Typhimurium SL1344 strain as template. The PCR products were digested with *EcoRI* and/or *BamHI* restriction enzymes and then cloned into the pRS414 vector [74], digested with the same restriction enzymes.

4.6. β -galactosidase assay

Protein quantification and β -galactosidase activity were performed as previously described [75,76], with the following modifications. Samples were harvested from 1.5 ml of cell culture, then centrifuged, washed, resuspended in 0.8 ml of TDTT buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.8 and 30 μ M DL-dithiothreitol), and sonicated on an ice bath for 3 min with periods of 10 s of sonication and 10 s of rest. The homogenate was centrifuged, and the supernatant was used for protein and enzyme activity measurements. For β -galactosidase activity, 20 μ l of each extract was added to a 96-well microplate, followed by the addition of 200 μ l of 0.5 mg/ml *o*-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) resuspended in 1 \times Z buffer (0.06 M Na₂HPO₄, 0.046 M NaH₂PO₄, 0.01 M, KCl, 0.002 M MgSO₄, pH 7). The rate of each reaction was obtained by recording the change of absorbance at 405 nm every 15 s for 5 min, using an ELx808 scanning microplate reader and the Gen5 software (Biotek). The activities were obtained by interpolation with a standard curve (0–5400 U) that was previously stored in the Gen5 software. The protein concentration of each cell extract was obtained using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce). Bovine serum albumin was used as a protein standard. Enzyme activity and protein concentration values were used to calculate the β -galactosidase specific activity (U/mg).

4.7. Statistical analysis

Data from β -galactosidase assays were analyzed with Prism 6 program version 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA), using one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison test. A *P* value of <0.05 was considered to be significant.

CRedit authorship contribution statement

Jessica Nava-Galeana: Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Cinthia Núñez:** Writing – review & editing. **Víctor H. Bustamante:** Conceptualization, Methodology, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Table 2
Primers used in this work.

Primer	Sequence (5'-3') ¹	Target gene	RE ²
For <i>lacZ</i> -translational fusions			
<i>yqcCB-FwEcoRI</i>	CCTGAATTCGTGCGCAGGATGCAAACGTTCC	<i>yqcC</i>	EcoRI
<i>yqcCB-RvBamHI</i>	CCTGGATCCAACCTGCTGACGCACACGGTCC	<i>yqcC</i>	BamHI
<i>cbiAP-FwEcoRI</i>	CCTGAATTCATCCTCCATCGTTATG	<i>cbiA</i>	EcoRI
<i>cbiAP-RvBamHI</i>	CCTGGATCCCAACCGCTTCCTGTGCCTGC	<i>cbiA</i>	BamHI
<i>repA-FwEcoRI</i>	CTTGAATTCGGTACAGGATTCACAATACACC	<i>repA2</i>	EcoRI
<i>R3-repA-BamHI</i>	CTTGGATCCGGCTGCACGGTATTACTGGC	<i>repA2</i>	BamHI
<i>yebF-FwEcoRI</i>	GCGAATTCGGACCGCGAGTAAACG	<i>yebF</i>	EcoRI
<i>yebF-RvBamHI</i>	CCTGGATCCAGCAGGCTCAACAACGCTCC	<i>yebF</i>	BamHI
<i>hilDF-EcoRI</i>	GAGGAATTCACCTCTGACCTACCACAAAGAG	<i>hilD</i>	EcoRI
<i>hilDR-BamHI</i>	ATTTGGATCCGTAACCTGCTGAGTCTGAC	<i>hilD</i>	BamHI
<i>pduA-FwEcoRI</i>	CTTGAATTCCTTTGAGCGGCTCAAACAAC	<i>pduA</i>	EcoRI
<i>R2pduA-BamHI</i>	CTTGGATCCCTTTGGTTTCTACCATTCTAG	<i>pduA</i>	BamHI

¹ Italic letters indicate the respective restriction enzyme site in the primer.

² RE, restriction enzyme for which a site was generated in the primer.

Data availability

No

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM / México (IN206321) and from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) / México (254531) to V.H.B. J.N.-G. was supported by master and doctoral fellowships from CONACYT (429934 and 679158, respectively).

We thank Luary C. Martínez for constructing the *phlD-lacZ* plasmid, F.J. Santana and M. Fernández-Mora for technical assistance, and I. Martínez-Flores for critical reading of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2023.104960>.

References

- A.J. Bäuml, R.M. Tsois, T.A. Ficht, L.G. Adams, Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*, *Infect. Immun.* 66 (1998) 4579–4587, <https://doi.org/10.1128/iai.66.10.4579-4587.1998>.
- N.A. Feasey, G. Dougan, R.A. Kingsley, R.S. Heyderman, M.A. Gordon, Invasive non-typhoidal *Salmonella* disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa, *Lancet*. 379 (2012) 2489–2499, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61752-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61752-2).
- A. Andino, I. Hanning, *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars, *Sci. World J.* 2015 (2015), 520179, <https://doi.org/10.1155/2015/520179>.
- E.A. Groisman, H. Ochman, Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps, *Cell*. 87 (1996) 791–794, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81985-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81985-6).
- P. Desai, S. Porwollik, F. Long, P. Cheng, A. Wollam, S.W. Clifton, G. Weinstock, M. McClelland, Evolutionary genomics of *Salmonella enterica* subspecies, *MBio*. 4 (2013), <https://doi.org/10.1128/mBio.00579-12> e00579–12.
- A. Haraga, M.B. Ohlson, S.I. Miller, *Salmonellae* interplay with host cells, *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (2008) 53–66, <https://doi.org/10.1038/nrmicro1788>.
- A.M.P. dos Santos, R.G. Ferrari, C.A. Conte-Junior, Virulence factors in *Salmonella* Typhimurium: the sagacity of a bacterium, *Curr. Microbiol.* 76 (2019) 762–773, <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1510-4>.
- A. Fàbrega, J. Vila, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation, *Clin. Microbiol. Rev.* 26 (2013) 308–341, <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>.
- B.L. Petrone, A.M. Stringer, J.T. Wade, Identification of *HilD*-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *J. Bacteriol.* 196 (2014) 1094–1101, <https://doi.org/10.1128/JB.01449-13>.
- C. Smith, A.M. Stringer, C. Mao, M.J. Palumbo, J.T. Wade, Mapping the regulatory network for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion, *MBio*. 7 (2016), <https://doi.org/10.1128/mBio.01024-16> e01024–16.
- V.H. Bustamante, L.C. Martínez, F.J. Santana, L.A. Knodler, O. Steele-Mortimer, J. L. Puente, *HilD*-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 14591–14596, <https://doi.org/10.1073/pnas.0801205105>.
- R.C. Laughlin, L.A. Knodler, R. Barhoumi, H. Ross Payne, J. Wu, G. Gomez, R. Pugh, S.D. Lawhon, A.J. Bäuml, O. Steele-Mortimer, L. Garry Adams, Spatial segregation of virulence gene expression during acute enteric infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *MBio*. 5 (2014), <https://doi.org/10.1128/mBio.00946-13> e00946–13.
- Y.A. Golubeva, A.Y. Sadik, J.R. Ellermeier, J.M. Slauch, Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system, *Genetics*. 190 (2012) 79–90, <https://doi.org/10.1534/genetics.111.132779>.
- L. Lou, P. Zhang, R. Piao, Y. Wang, *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and its complex regulatory network, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9 (2019) 270, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00270>.
- L.C. Martínez, H. Yakhnin, M.I. Camacho, D. Georgellis, P. Babitzke, J.L. Puente, V. H. Bustamante, 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 (2011) 1637–1656, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07674.x>.
- C.C. Hung, C.R. Eade, M.I. Betteken, P.D. Pavinski Bitar, E.M. Handley, S. L. Nugent, R. Chowdhury, C. Altier, *Salmonella* invasion is controlled through the secondary structure of the *hilD* transcript, *PLoS Pathog.* 15 (2019), e1007700, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007700>.
- L.C. Martínez, I. Martínez-Flores, H. Salgado, M. Fernández-Mora, A. Medina-Rivera, J.L. Puente, J. Collado-Vides, V.H. Bustamante, *In silico* identification and experimental characterization of regulatory elements controlling the expression of the *Salmonella csrB* and *csrC* genes, *J. Bacteriol.* 196 (2014) 325–336, <https://doi.org/10.1128/JB.00806-13>.
- C. Pourciau, Y.-J. Lai, M. Gorelik, P. Babitzke, T. Romeo, Diverse mechanisms and circuitry for global regulation by the RNA-binding protein CsrA, *Front. Microbiol.* 11 (2020), 601352, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.601352>.
- C.A. Vakulskas, A.H. Potts, P. Babitzke, B.M.M. Ahmer, T. Romeo, Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79 (2015) 193–224, <https://doi.org/10.1128/mmb.00052-14>.
- A.K. Dubey, C.S. Baker, T. Romeo, P. Babitzke, RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction, *RNA*. 11 (2005) 1579–1587, <https://doi.org/10.1261/rna.2990205>.
- J. Mercante, A.N. Edwards, A.K. Dubey, P. Babitzke, T. Romeo, Molecular geometry of CsrA (RsmA) binding to RNA and its implications for regulated expression, *J. Mol. Biol.* 392 (2009) 511–528, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.07.034>.
- M.Y. Liu, G. Gui, B. Wei, J.F. Preston, L. Oakford, Ü. Yüksel, D.P. Giedroc, T. Romeo, The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 17502–17510, <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17502>.
- T. Weilbacher, K. Suzuki, A.K. Dubey, X. Wang, S. Gudapaty, I. Morozov, C. S. Baker, D. Georgellis, P. Babitzke, T. Romeo, A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 657–670, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03459.x>.
- S.D. Lawhon, R. Maurer, M. Suyemoto, C. Altier, Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA, *Mol. Microbiol.* 46 (2002) 1451–1464, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03268.x>.
- Y. Huang, M. Suyemoto, C.D. Garner, K.M. Cicconi, C. Altier, Formate acts as a diffusible signal to induce *Salmonella* invasion, *J. Bacteriol.* 190 (2008) 4233–4241, <https://doi.org/10.1128/JB.00205-08>.
- R.G. Chavez, A.F. Alvarez, T. Romeo, D. Georgellis, The physiological stimulus for the BarA sensor kinase, *J. Bacteriol.* 192 (2010) 2009–2012, <https://doi.org/10.1128/JB.01685-09>.
- A.F. Alvarez, C. Rodríguez, R. González-Chávez, D. Georgellis, The *Escherichia coli* two-component signal sensor BarA binds protonated acetate via a conserved hydrophobic-binding pocket, *J. Biol. Chem.* 297 (2021), 101383, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101383>.
- M. Price-Carter, J. Tingey, J.R. Roth, The alternative electron acceptor tetrathionate supports B₁₂-dependent anaerobic growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 2463–2475, <https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2463-2475.2001>.
- S.E. Winter, P. Thiennimitr, M.G. Winter, B.P. Butler, D.L. Huseby, R.W. Crawford, J.M. Russell, C.L. Bevins, L.G. Adams, R.M. Tsois, J.R. Roth, A.J. Bäuml, Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*, *Nature*. 467 (2010) 426–429, <https://doi.org/10.1038/nature09415>.
- C. Altier, M. Suyemoto, S.D. Lawhon, Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion genes by *csrA*, *Infect. Immun.* 68 (2000) 6790–6797, <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6790-6797.2000>.
- B.L. Wei, A.M. Brun-Zinkernagel, J.W. Simecka, B.M. Prüß, P. Babitzke, T. Romeo, Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 40 (2001) 245–256, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02380.x>.
- M. Tepitski, R.I. Goodier, B.M.M. Ahmer, Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 7257–7265, <https://doi.org/10.1128/JB.185.24.7257-7265.2003>.
- A.V. Yakhnin, C.S. Baker, C.A. Vakulskas, H. Yakhnin, I. Berezin, T. Romeo, P. Babitzke, CsrA activates *flhDC* expression by protecting *flhDC* mRNA from RNase E-mediated cleavage, *Mol. Microbiol.* 87 (2013) 851–866, <https://doi.org/10.1111/mmi.12136>.
- N.A. Sabnis, H. Yang, T. Romeo, Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 29096–29104, <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29096>.
- T. Romeo, Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB, *Mol. Microbiol.* 29 (1998) 1321–1330, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01021.x>.
- S.W. Sowa, G. Gelderman, A.N. Leistra, A. Buvanendiran, S. Lipp, A. Pitaktong, C. A. Vakulskas, T. Romeo, M. Baldea, L.M. Contreras, Integrative FourD omics approach profiles the target network of the carbon storage regulatory system, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) 1673–1686, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx048>.
- E. Holmqvist, P.R. Wright, L. Li, T. Bischler, L. Barquist, R. Reinhardt, R. Backofen, J. Vogel, Global RNA recognition patterns of post-transcriptional regulators Hfq and CsrA revealed by UV crosslinking *in vivo*, *EMBO J.* 35 (2016) 991–1011, <https://doi.org/10.1525/embj.201593360>.
- A.H. Potts, Y. Guo, B.M.M. Ahmer, T. Romeo, Role of CsrA in stress responses and metabolism important for *Salmonella* virulence revealed by integrated transcriptomics, *PLoS One* 14 (2019), e0211430, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211430>.
- V. Berndt, M. Beckstette, M. Volk, P. Dersch, M. Brönstrup, Metabolome and transcriptome-wide effects of the carbon storage regulator in an enteropathogenic *Escherichia coli*, *Sci. Rep.* 9 (2019) 138, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36932-w>.
- P.R. Kulkarni, T. Jia, S.A. Kuehne, T.M. Kerkering, E.R. Morris, M.S. Searle, S. Heeb, J. Rao, R.V. Kulkarni, A sequence-based approach for prediction of CsrA/RsmA targets in bacteria with experimental validation in *Pseudomonas aeruginosa*, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 6811–6825, <https://doi.org/10.1093/nar/gku309>.

- [41] A.E. McKee, B.J. Rutherford, D.C. Chivian, E.K. Baidoo, D. Juminaga, D. Kuo, P. I. Benke, J.A. Dietrich, S.M. Ma, A.P. Arkin, C.J. Petzold, P.D. Adams, J.D. Keasling, S.R. Chhabra, Manipulation of the carbon storage regulator system for metabolite remodeling and biofuel production in *Escherichia coli*, *Microb. Cell Factories* 11 (2012) 79, <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-79>.
- [42] A.N. Edwards, L.M. Patterson-Fortin, C.A. Vakulskas, J.W. Mercante, K. Potrykus, D. Vinella, M.L. Camacho, J.A. Fields, S.A. Thompson, D. Georgellis, M. Cashel, P. Babitzke, T. Romeo, Circuitry linking the Csr and stringent response global regulatory systems, *Mol. Microbiol.* 80 (2011) 1561–1580, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07663.x>.
- [43] T. Esquerré, M. Bouvier, C. Turlan, A.J. Carpousis, L. Girbal, M. Coccagn-Bousquet, The Csr system regulates genome-wide mRNA stability and transcription and thus gene expression in *Escherichia coli*, *Sci. Rep.* 6 (2016) 25057, <https://doi.org/10.1038/srep25057>.
- [44] T.R. Zere, C.A. Vakulskas, Y. Leng, A. Pannuri, A.H. Potts, R. Dias, D. Tang, B. Kolaczowski, D. Georgellis, B.M.M. Amher, T. Romeo, Genomic targets and features of BarA-UvrY (-SirA) signal transduction systems, *PLoS One* 10 (2015), e0145035, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145035>.
- [45] S.D. Lawhon, J.G. Frye, M. Suyemoto, S. Porwollik, M. McClelland, C. Altier, Global regulation by CsrA in *Salmonella typhimurium*, *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 1633–1645, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03535.x>.
- [46] A.M. Colgan, C. Kröger, M. Diard, W.D. Hardt, J.L. Puente, S.K. Sivasankaran, K. Hokamp, J.C.D. Hinton, The impact of 18 ancestral and horizontally-acquired regulatory proteins upon the transcriptome and sRNA landscape of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *PLoS Genet.* 12 (2016), e1006258, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006258>.
- [47] A.H. Potts, C.A. Vakulskas, A. Pannuri, H. Yakhnin, P. Babitzke, T. Romeo, Global role of the bacterial post-transcriptional regulator CsrA revealed by integrated transcriptomics, *Nat. Commun.* 8 (2017) 1596, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01613-1>.
- [48] T. Romeo, P. Babitzke, Global regulation by CsrA and its RNA antagonists, *Microbiol. Spectr.* 6 (2018), <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0009-2017>. RWR-0009-2017.
- [49] D.R. Fortune, M. Suyemoto, C. Altier, Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Infect. Immun.* 74 (2006) 331–339, <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.331-339.2006>.
- [50] H. Salvail, E.A. Groisman, The phosphorelay BarA/SirA activates the non-cognate regulator RcsB in *Salmonella enterica*, *PLoS Genet.* 16 (2020), e1008722, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008722>.
- [51] J.R. Roth, J.G. Lawrence, M. Rubenfield, S. Kieffer-Higgins, G.M. Church, Characterization of the cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthetic genes of *Salmonella* Typhimurium, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 3303–3316, <https://doi.org/10.1128/jb.175.11.3303-3316.1993>.
- [52] J.R. Roth, J.G. Lawrence, T.A. Bobik, Cobalamin (coenzyme B₁₂): synthesis and biological significance, *Annu. Rev. Microbiol.* 50 (1996) 137–181, <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.137>.
- [53] K. Suzuki, X. Wang, T. Weillbacher, A.-K. Pernestig, O. Melefors, D. Georgellis, P. Babitzke, T. Romeo, Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 184 (2002) 5130–5140, <https://doi.org/10.1128/JB.184.18.5130-5140.2002>.
- [54] T.A. Bobik, G.D. Havemann, R.J. Busch, D.S. Williams, H.C. Aldrich, The propanediol utilization (*pdu*) operon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 includes genes necessary for formation of polyhedral organelles involved in coenzyme B₁₂-dependent 1,2-propanediol degradation, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 5967–5975, <https://doi.org/10.1128/JB.181.19.5967-5975.1999>.
- [55] G.A. Garcia, K.A. Koch, S. Chong, tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: overexpression, purification and quaternary structure, *J. Mol. Biol.* 231 (1993) 489–497, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1296>.
- [56] Y. Sakai, S. Kimura, T. Suzuki, Dual pathways of tRNA hydroxylation ensure efficient translation by expanding decoding capability, *Nat. Commun.* 10 (2019) 2858, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10750-8>.
- [57] S. Thong, B. Ercean, F. Torta, Z.Y. Fong, H.Y. Alvina Wong, M.R. Wenk, S.S. Chng, Defining key roles for auxiliary proteins in an ABC transporter that maintains bacterial outer membrane lipid asymmetry, *Elife* 5 (2016), e19042, <https://doi.org/10.7554/eLife.19042>.
- [58] M. Hensel, A.P. Hinsley, T. Nikolaus, G. Sawers, B.C. Berks, The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*, *Mol. Microbiol.* 32 (1999) 275–287, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01345.x>.
- [59] P. Thiennimitr, S.E. Winter, M.G. Winter, M.N. Xavier, V. Tolstikov, D.L. Huseby, T. Sterzenbach, R.M. Tsohis, J.R. Roth, A.J. Bäumlner, Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 17480–17485, <https://doi.org/10.1073/pnas.1107857108>.
- [60] F. Faber, P. Thiennimitr, L. Spiga, M.X. Byndloss, Y. Litvak, S. Lawhon, H. L. Andrews-Polymenis, S.E. Winter, A.J. Bäumlner, Respiration of microbiota-derived 1,2-propanediol drives *Salmonella* expansion during colitis, *PLoS Pathog.* 13 (2017), e1006129, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006129>.
- [61] M.J. Worley, K.H.L. Ching, F. Heffron, *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes, *Mol. Microbiol.* 36 (2000) 749–761, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01902.x>.
- [62] R.R. Chaudhuri, E. Morgan, S.E. Peters, S.J. Pleasance, D.L. Hudson, H.M. Davies, J. Wang, P.M. van Diemen, A.M. Buckley, A.J. Bowen, G.D. Pullinger, D.J. Turner, G.C. Langridge, A.K. Turner, J. Parkhill, I.G. Charles, D.J. Maskell, M.P. Stevens, Comprehensive assignment of roles for *Salmonella* Typhimurium genes in intestinal colonization of food-producing animals, *PLoS Genet.* 9 (2013), e1003456, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003456>.
- [63] I. Hautefort, M.J. Proença, J.C.D. Hinton, Single-copy green fluorescent protein gene fusions allow accurate measurement of *Salmonella* gene expression *in vitro* and during infection of mammalian cells, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 7480–7491, <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7480-7491.2003>.
- [64] M. Ackermann, B. Stecher, N.E. Freed, P. Songhet, W.D. Hardt, M. Doebeli, Self-destructive cooperation mediated by phenotypic noise, *Nature* 454 (2008) 987–990, <https://doi.org/10.1038/nature07067>.
- [65] M. Diard, V. Garcia, L. Maier, M.N.P. Remus-Emsermann, R.R. Regoes, M. Ackermann, W.D. Hardt, Stabilization of cooperative virulence by the expression of an avirulent phenotype, *Nature* 494 (2013) 353–356, <https://doi.org/10.1038/nature11913>.
- [66] A. Sturm, M. Heinemann, M. Arnoldini, A. Benecke, M. Ackermann, M. Benz, J. Dormann, W.D. Hardt, The cost of virulence: retarded growth of *Salmonella* Typhimurium cells expressing type III secretion system 1, *PLoS Pathog.* 7 (2011), e1002143, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002143>.
- [67] M. Diard, W.D. Hardt, Basic processes in *Salmonella*-host interactions: within-host evolution and the transmission of the virulent genotype, *Microbiol. Spectr.* 5 (2017) 1–11, <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mtbp-0012-2016>.
- [68] M.A. Sánchez-Romero, J. Casadesús, Contribution of SPI-1 bistability to *Salmonella enterica* cooperative virulence: insights from single cell analysis, *Sci. Rep.* 8 (2018) 14875, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33137-z>.
- [69] B.C. Searle, Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies, *Proteomics* 10 (2010) 1265–1269, <https://doi.org/10.1002/pmic.200900437>.
- [70] A. Keller, A.I. Nesvizhskii, E. Kolker, R. Aebersold, Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5383–5392, <https://doi.org/10.1021/ac025747h>.
- [71] A.I. Nesvizhskii, A. Keller, E. Kolker, R. Aebersold, A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4646–4658, <https://doi.org/10.1021/ac0341261>.
- [72] W. Zhu, J.W. Smith, C.M. Huang, Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics, *J. Biomed. Biotechnol.* 2010 (2010), 840518, <https://doi.org/10.1155/2010/840518>.
- [73] N. Deng, Z. Li, C. Pan, H. Duan, freeQuant: a mass spectrometry label-free quantification software tool for complex proteome analysis, *Sci. World J.* 2015 (2015), 137076, <https://doi.org/10.1155/2015/137076>.
- [74] R.W. Simons, F. Houman, N. Kleckner, Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions, *Gene* 53 (1987) 85–96, [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90095-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90095-3).
- [75] R. Oropeza, C.L. Sampieri, J.L. Puente, E. Calva, Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR, *Mol. Microbiol.* 32 (1999) 243–252, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01329.x>.
- [76] J.L. Puente, D. Bieber, S.W. Ramer, W. Murray, G.K. Schoolnik, The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals, *Mol. Microbiol.* 20 (1996) 87–100, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02491.x>.
- [77] S. Babicki, D. Arndt, A. Marcu, Y. Liang, J.R. Grant, A. Maciejewski, D.S. Wishart, Heatmapper: web-enabled heat mapping for all, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) W147–W153, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw419>.
- [78] S.K. Hoiseth, B.A.D. Stocker, Aromatic-dependent *S. typhimurium* are non virulent and effective as live vaccines, *Nature* 291 (1981) 238–239, <https://doi.org/10.1038/291238a0>.
- [79] D. Pérez-Morales, J. Nava-Galeana, R. Rosales-Reyes, P. Teehan, H. Yakhnin, E. I. Melchy-Pérez, Y. Rosenstein, M.A. De La Cruz, P. Babitzke, V.H. Bustamante, An incoherent feedforward loop formed by SirA/BarA, HilE and HilD is involved in controlling the growth cost of virulence factor expression by *Salmonella* Typhimurium, *PLoS Pathog.* 17 (2021), e1009630, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009630>.
- [80] M.P. Mayer, A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript, *Gene* 163 (1995) 41–46, [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00389-N](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00389-N).

Artículos de coautor publicados durante el doctorado

RESEARCH ARTICLE

An incoherent feedforward loop formed by SirA/BarA, HilE and HilD is involved in controlling the growth cost of virulence factor expression by *Salmonella* Typhimurium

Deyanira Pérez-Morales^{1,2}, Jessica Nava-Galeana¹, Roberto Rosales-Reyes³, Paige Teehan⁴, Helen Yakhnin⁴, Erika I. Melchy-Pérez⁵, Yvonne Rosenstein⁵, Miguel A. De la Cruz⁶, Paul Babitzke⁴, Víctor H. Bustamante^{1*}

1 Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, **2** Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Ciudad de México, México, **3** Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, **4** Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center for RNA Molecular Biology, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, United States of America, **5** Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, **6** Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

* victor.bustamante@ibt.unam.mx



OPEN ACCESS

Citation: Pérez-Morales D, Nava-Galeana J, Rosales-Reyes R, Teehan P, Yakhnin H, Melchy-Pérez EI, et al. (2021) An incoherent feedforward loop formed by SirA/BarA, HilE and HilD is involved in controlling the growth cost of virulence factor expression by *Salmonella* Typhimurium. PLoS Pathog 17(5): e1009630. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009630>

Editor: William Navarre, University of Toronto, CANADA

Received: July 2, 2020

Accepted: May 10, 2021

Published: May 28, 2021

Copyright: © 2021 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 manuscript.

Funding: This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) / México (254531) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM / México (IN202418) to V.H.B., from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) / México (256263) to M.A.D.C., and

Abstract

An intricate regulatory network controls the expression of *Salmonella* virulence genes. The transcriptional regulator HilD plays a central role in this network by controlling the expression of tens of genes mainly required for intestinal colonization. Accordingly, the expression/activity of HilD is highly regulated by multiple factors, such as the SirA/BarA two-component system and the Hcp-like protein HilE. SirA/BarA positively regulates translation of *hilD* mRNA through a regulatory cascade involving the small RNAs CsrB and CsrC, and the RNA-binding protein CsrA, whereas HilE inhibits HilD activity by protein-protein interaction. In this study, we show that SirA/BarA also positively regulates translation of *hilE* mRNA through the same mentioned regulatory cascade. Thus, our results reveal a paradoxical regulation exerted by SirA/BarA-Csr on HilD, which involves simultaneous opposite effects, direct positive control and indirect negative control through HilE. This kind of regulation is called an incoherent type-1 feedforward loop (I1-FFL), which is a motif present in certain regulatory networks and represents a complex biological problem to decipher. Interestingly, our results, together with those from a previous study, indicate that HilE, the repressor component of the I1-FFL reported here (I1-FFL_{SirA/BarA-HilE-HilD}), is required to reduce the growth cost imposed by the expression of the genes regulated by HilD. Moreover, we and others found that HilE is necessary for successful intestinal colonization by *Salmonella*. Thus, these findings support that I1-FFL_{SirA/BarA-HilE-HilD} cooperates to control the precise amount and activity of HilD, for an appropriate balance between the growth cost and the virulence benefit generated by the expression of the genes induced by this regulator. I1-FFL_{SirA/BarA-HilE-HilD} represents a complex regulatory I1-FFL that involves multiple regulators acting at



The Two-Component System CpxRA Represses *Salmonella* Pathogenicity Island 2 by Directly Acting on the *ssrAB* Regulatory Operon

Nancy León-Montes,^{a,b} Jessica Nava-Galeana,^c Diana Rodríguez-Valverde,^{a,b} Jorge Soria-Bustos,^a  Roberto Rosales-Reyes,^d Sandra Rivera-Gutiérrez,^b  Hidetada Hirakawa,^e Miguel A. Ares,^{a,b} Víctor H. Bustamante,^c Miguel A. De la Cruz^a

^aUnidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

^bDepartamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

^cDepartamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico

^dUnidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^eDepartment of Bacteriology, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi, Japan

ABSTRACT The acquisition of *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) conferred on *Salmonella* the ability to survive and replicate within host cells. The *ssrAB* bicistronic operon, located in SPI-2, encodes the SsrAB two-component system (TCS), which is the central positive regulator that induces the expression of SPI-2 genes as well as other genes located outside this island. On the other hand, CpxRA is a two-component system that regulates expression of virulence genes in many bacteria in response to different stimuli that perturb the cell envelope. We previously reported that the CpxRA system represses the expression of SPI-1 and SPI-2 genes under SPI-1-inducing conditions by decreasing the stability of the SPI-1 regulator HilD. Here, we show that under SPI-2-inducing conditions, which mimic the intracellular environment, CpxRA represses the expression of SPI-2 genes by the direct action of phosphorylated CpxR (CpxR-P) on the *ssrAB* regulatory operon. CpxR-P recognized two sites located proximal and distal from the promoter located upstream of *ssrA*. Consistently, we found that CpxRA reduces the replication of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium inside murine macrophages. Therefore, our results reveal CpxRA as an additional regulator involved in the intracellular lifestyle of *Salmonella*, which in turn adds a new layer to the intricate regulatory network controlling the expression of *Salmonella* virulence genes.

IMPORTANCE SPI-2 encodes a type III secretion system (T3SS) that is a hallmark for the species *Salmonella enterica*, which is essential for the survival and replication within macrophages. Expression of SPI-2 genes is positively controlled by the two-component system SsrAB. Here, we determined a regulatory mechanism involved in controlling the overgrowth of *Salmonella* inside macrophages. In this mechanism, CpxRA, a two-component system that is activated by extracytoplasmic stress, directly represses expression of the *ssrAB* regulatory operon; as a consequence, expression of SsrAB target genes is decreased. Our findings reveal a novel mechanism involved in the intracellular lifestyle of *Salmonella*, which is expected to sense perturbations in the bacterial envelope that *Salmonella* faces inside host cells, as the synthesis of the T3SS-2 itself.

KEYWORDS CpxRA, SPI-2, *ssrAB*, *Salmonella*, *cpxRA*

Salmonella is a common etiological agent of gastrointestinal disease transmitted by food or water (1, 2). The genus *Salmonella* is composed of two species: *Salmonella enterica*, which comprises six subspecies, and *Salmonella bongori*. So far, over 2,600

Editor Eric Cascales, Centre national de la recherche scientifique, Aix-Marseille Université

Copyright © 2022 León-Montes et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Miguel A. De la Cruz, miguel_angel_81@live.com, or Víctor H. Bustamante, victor.bustamante@ibt.unam.mx.

The authors declare no conflict of interest.

Received 27 July 2022

Accepted 15 August 2022



Two Additional Connections between the Transcriptional Programs Controlling Invasion and Intracellular Replication of *Salmonella*: HilD-SprB Positively Regulates *phoP* and *slyA*

María M. Banda,^a Deyanira Pérez-Morales,^{a*} Crispín Zavala-Alvarado,^{a§} Jessica Nava-Galeana,^a Víctor H. Bustamante^a

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

María M. Banda and Deyanira Pérez-Morales contributed equally to this work. María M. Banda was responsible for the writing and thus is listed first.

ABSTRACT *Salmonella* virulence relies on the ability of this bacterium to invade the intestinal epithelium and to replicate inside macrophages, which are functions mainly encoded in *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 (SPI-1 and SPI-2), respectively. Complex regulatory programs control the expression of SPI-1 and SPI-2 and functionally related genes, involving the integration of ancestral regulators and regulators that *Salmonella* has acquired during its evolution. Interestingly, some previous studies have revealed cross talk between the regulatory programs for SPI-1 and SPI-2. Here, we report two additional connections between the regulatory programs controlling the expression of genes for invasion and intracellular replication. Our results show that the acquired regulators HilD and SprB, both encoded in SPI-1, induce, in a cascade fashion, the expression of PhoP and SlyA, two ancestral regulators that activate the expression of SPI-2 and other genes required for intracellular replication. We provide evidence supporting that the regulation of *phoP* and *slyA* by HilD-SprB was adapted during the divergence of *Salmonella* from its closer species, *Escherichia coli*, with the acquisition of SPI-1 and thus the gain of HilD and SprB, as well as through *cis*-regulatory evolution of *phoP* and *slyA*. Therefore, our study further expands the knowledge about the intricate regulatory network controlling the expression of virulence genes in *Salmonella*.

IMPORTANCE Bacteria have developed diverse regulatory mechanisms to control genetic expression, in the case of pathogenic bacteria, to induce the expression of virulence genes in particular niches during host infection. In *Salmonella*, an intricate regulatory network has been determined, which controls the spatiotemporal expression of the SPI-1 and SPI-2 gene clusters that mediate the invasion to and the replication inside host cells, respectively. In this study, we report two additional pathways of cross talk between the transcriptional programs for SPI-1 and SPI-2. Additionally, our results support that these additional regulatory pathways were adapted during the divergence of *Salmonella* from its closer species, *Escherichia coli*. This study further expands the knowledge about the mechanisms determining the *Salmonella* virulence.

KEYWORDS *Salmonella*, HilD, SprB, PhoP, SlyA, transcriptional regulation, cross talk, intracellular replication, regulatory evolution, virulence genes

Salmonella enterica serovars are a common cause of intestinal or systemic infections in humans and many other animals. Serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) can produce both of these infections, depending on the host, thus, it is widely used for the study of *Salmonella* virulence mechanisms in laboratory assays as well as in animal models (1, 2).

Salmonella virulence mostly relies on the presence of two large clusters of chromosomal genes denominated *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 2 (SPI-1 and SPI-2),

Editor Patricia A. Champion, University of Notre Dame

Copyright © 2022 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

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

*Present address: Deyanira Pérez-Morales, Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, Ciudad de México, México.

§Present address: Crispín Zavala-Alvarado, Institute Pasteur, Université de Paris, Individualité Microbienne et Infection, Paris, France.

The authors declare no conflict of interest.

Received 26 May 2022

Accepted 12 September 2022

Published 10 October 2022