



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“Participación del sistema CRISPR-Cas en la regulación transcripcional de proteínas de membrana externa de *S. Typhi* IMSS-1”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Biól. Sarahi Rodríguez Gutiérrez

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Ismael Hernández Lucas
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Juan Miranda Ríos
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Dr. Daniel Genaro Segura González
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente proyecto se realizó en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología (UNAM), bajo la asesoría del Dr. Ismael Hernández Lucas, como parte del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Juan Miranda Ríos

(Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)

Dr. Daniel Genaro Segura González

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. Ismael Hernández Lucas

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Jurado designado para el examen de grado:

Dr. David René Romero Camarena

(Centro de Ciencias Genómicas)

Dr. Claudia Martínez Anaya

(Instituto de Biotecnología, UNAM)

Dr. Laura Rosa Camarena Mejía

(Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)

Dr. Miguel Yañez Cocotl

(Facultad de Medicina, UNAM)

Dr. Christian Sohlenkamp

(Centro de Ciencias Genómicas)

Para la realización de este trabajo la alumna recibió beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. CVU/Becario: 887111/703306).

Índice

Resumen	4
Abstract	5
Introducción	6
Infección por <i>Salmonella</i> Typhi	7
CRISPR-Cas como sistema inmune adaptativo	10
CRISPR-Cas participa en distintos procesos biológicos	13
Antecedentes	17
CRISPR-Cas en <i>S. Typhi</i> IMSS-1	17
Hipótesis	19
Objetivos	19
Objetivo general	19
Objetivos particulares	19
Material y Métodos	20
Resultados	29
Elementos genéticos del sistema CRISPR-Cas involucrados en la expresión de OmpR en <i>S. Typhi</i> IMSS-1	29
CRISPR-Cas está involucrado en la regulación positiva de <i>ompS2</i> en <i>S. Typhi</i> IMSS-1	30
CRISPR-Cas regula OmpR para la síntesis de OmpS2 en <i>S. Typhi</i> IMSS-1	36
<i>cse2</i> , <i>cas5</i> , <i>cas6e</i> , <i>cas1</i> , <i>cas2</i> y <i>cas3</i> están involucrados en el control positivo de <i>ompS2</i>	37
Participación del sistema CRISPR-Cas en la regulación de proteínas de membrana externa en distintas bacterias de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	38
Discusión	40
Conclusiones	40
43Bibliografía	44

Resumen

En este trabajo se demostró que el sistema CRISPR-Cas está involucrado en la regulación positiva de proteínas de la membrana externa en *Salmonella enterica* serovar Typhi IMSS-1.

La presencia del sistema CRISPR-Cas junto con la sobreexpresión de LeuO induce la síntesis de OmpS2; sin embargo, en mutantes individuales *cse2*, *cas5*, *cas6e*, *cas1*, *cas2* y *cas3*, el regulador transcripcional LeuO es incapaz de inducir positivamente la expresión de la porina OmpS2.

En este trabajo también se determinó que la expresión del regulador transcripcional OmpR depende de las proteínas Cse2, Cas5, Cas6e, Cas1, Cas2 y Cas3. Por lo tanto, los datos sugieren que las proteínas Cas modulan la expresión de OmpR para controlar la síntesis de proteínas de la membrana externa OmpC, OmpF y OmpS2 en *S. Typhi* IMSS-1.

Abstract

In this work it was shown that the CRISPR-Cas system exerts a positive control on the regulation of outer membrane proteins in *Salmonella enterica* serovar Typhi IMSS-1 was demonstrated.

The presence of the CRISPR-Cas system together with *leuO* overexpression induce OmpS2 synthesis, however in individual *cse2*, *cas5*, *cas6e*, *cas1*, *cas2* and *cas3* mutants, the LeuO transcriptional regulator was unable to positively induce the expression of the quiescent porin OmpS2.

In addition, we determined that the expression of the transcriptional regulator OmpR depends on the proteins Cse2, Cas5, Cas6e, Cas1, Cas2 and Cas3. Therefore, the data suggest that Cas proteins modulate OmpR expression to control outer membrane protein synthesis in *S. Typhi* IMSS-1.

Introducción

Las bacterias del género *Salmonella* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos anaerobios facultativos, Gram-negativos que miden de 2 a 3 μm de largo y de 0.4 a 0.6 μm de diámetro. Son fermentadoras de glucosa, pero no fermentan lactosa, producen ácido sulfhídrico, reducen nitratos y son oxidasa negativos (Mandell et al., 2015; Ryan et al., 2017).

El género *Salmonella* se divide en dos especies: 1) *Salmonella enterica*, que contiene 6 subespecies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae*) y 2) *Salmonella bongori*. Actualmente se conocen más de 2,600 serovares de *Salmonella enterica* (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014; Lou et al., 2019; Ryan et al., 2017). Estos serovares se clasifican a partir de diversos antígenos de superficies: polisacárido O (somático), antígeno Vi (capsular) y antígeno H (flagelar) (Ryan et al., 2017).

Las bacterias del género *Salmonella* son relevantes desde el punto de vista médico por su capacidad de generar cuadros clínicos diversos en humanos (Ryan et al., 2017). Para fines clínicos se han clasificado en invasivas (tifoideas) y no invasivas (no tifoideas) (Cook & Zumla, 2008). Los serovares que producen una enfermedad invasiva como la fiebre tifoidea y paratifoidea son *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhi (*S. Typhi*) y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Paratyphi (*S. Paratyphi*) A, B y C, que tienen como único hospedero al ser humano (Cook & Zumla, 2008; Mandell et al., 2015). Estos patógenos se caracterizan por provocar infecciones sistémicas que representan un problema de salud a nivel mundial (Cárdenas, 2016; Ilyas et al., 2017; Mandell et al., 2015).

En México se ha reportado la presencia de 216 serotipos diferentes de *Salmonella enterica*, siendo Enteritidis, Typhimurium, Anatum, Agona y Meleagridis los serotipos más prevalentes (Contreras-Soto et al., 2019). De acuerdo con la Secretaría de Salud en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), los casos de salmonelosis a nivel nacional son reportados cada semana, cumpliendo con la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-1994. En México hasta la semana epidemiológica 38 del 2023 se reportó un total de 11, 277 casos de fiebre tifoidea, siendo Zacatecas y Veracruz los estados con mayor incidencia a nivel nacional con 1,821 y 1,951 casos respectivamente.

Los casos reportados de fiebre paratifoidea en el mismo periodo fueron 4,818, siendo Veracruz también el estado con mayor número de casos con 1, 541. A su vez la incidencia de otras salmonelosis provocadas por bacterias no tifoideas es de 34, 707 siendo Veracruz y Chiapas los estados con mayor incidencia con 8,200 y 9,825 respectivamente (SINAVE, 2023).

Infección por *Salmonella Typhi*

La infección por *S. Typhi* inicia a través de la ingesta de alimentos y agua contaminados. La dosis requerida para provocar fiebre tifoidea varía de 10^3 a 10^4 bacterias, mientras que el periodo de incubación generalmente es de dos semanas (Antillón et al., 2017; Waddington et al., 2014).

Después de ser ingerida, *S. Typhi* debe sobrevivir a las condiciones hostiles en el estómago, durante este trayecto el ambiente ácido sirve de estímulo para su replicación (Ahirwar et al., 2014). Si bien una alta proporción de bacterias mueren en el estómago, aquellas que sobreviven, migran al íleon terminal donde inician la internalización al epitelio a través de las células M de las placas de Peyer (Dougan & Baker 2014).

A su vez, se lleva a cabo la expresión de genes involucrados en la patogenicidad, los cuales pueden encontrarse en segmentos de ADN llamados islas de patogenicidad (SPI). Por ejemplo, la SPI-9 se expresa cuando la osmolaridad intestinal aumenta, mejorando la adherencia a las células epiteliales (Velásquez et al., 2016). Por su parte, la adhesión al epitelio se lleva a cabo a través de proteínas llamadas fimbrias (Berrocal et al., 2015). En el caso de *S. Typhi*, *fimH* ha sido relacionado con la capacidad de unirse específicamente a células epiteliales humanas (Yue et al., 2017). Es relevante mencionar que *S. Typhi* debe atravesar la mucosidad que recubre la pared intestinal (Nickerson et al., 2018; Salerno et al., 2018), la cual está enriquecida con péptidos antimicrobianos, incluidas las α -defensinas HD5 y HD6, así como las β -defensinas humanas 1 y 2 (Simuyandi & Kapulu 2016), y la inmunoglobulina secretora A (IgA) (Dahora et al., 2019).

En *S. Typhi*, la alta osmolaridad intestinal suprime la expresión de *tviA*, que codifica para una proteína involucrada en la biosíntesis de la cápsula Vi codificada dentro de SPI-7,

su represión da como resultado la expresión del sistema de secreción tipo III 1 (T3SS1) codificado por SPI-1. El T3SS1 permite la invasión del epitelio intestinal. Sin embargo, al entrar al epitelio, hay una reducción de la osmolaridad, esto provoca que *tviA* se exprese nuevamente, y por lo tanto, resulta en la regulación negativa del T3SS1 (Nuccio et al., 2010). De esta manera, *S. Typhi* se internaliza y al mismo tiempo la cápsula Vi le permite evadir la respuesta inmune asociada a la señalización de NF- κ B (Winter et al., 2014). La proteína TviA también participa en la regulación negativa de la flagelina evitando el reconocimiento por los receptores de membrana tipo Toll-5 (TLR-5) que reconocen patrones asociados a patógenos (Wilson et al., 2008).

Aunque la invasión dependiente de T3SS-1 está bien caracterizada, *S. Typhi* también puede atravesar las células epiteliales a través de la proteína STIV de la membrana externa, uniéndose al receptor tirosina quinasa Met para inducir su internalización (Chowdhury et al., 2019).

Una vez que atraviesa el epitelio, *S. Typhi* se disemina al bazo y al hígado a través de fagocitos mononucleares. Durante este proceso, la cápsula Vi de *S. Typhi* tiene diversos efectos inmunomoduladores, por ejemplo, enmascarar el LPS del reconocimiento por TLR-4 previniendo la liberación posterior de citoquinas inflamatorias TNF- α , IL6 o IL8 (Wilson et al., 2008) y reduciendo la fagocitosis mediada por BPI, una proteína antimicrobiana que se une al LPS de tal manera que evita evita que la célula huésped sufra piroptosis (Balakrishnan, et al., 2016).

Posteriormente para sobrevivir dentro de los macrófagos, *S. Typhi* forma una vacuola y expresa el operón *suf* (*sufABCDSE*), implicado en la producción de hierro y azufre bajo condiciones de estrés oxidativo (Wang et al., 2015). Además de ser necesario para el crecimiento bacteriano, el hierro activa el regulador de la absorción férrica de *S. Typhi* (Fur), reprimiendo los ARNs de RfrA y RfrB, promoviendo la resistencia al H₂O₂ y la supervivencia intracelular (Leclerc et al., 2013).

Dentro de los macrófagos, *S. Typhi* también debe evitar la muerte mediada por la proteína Rab32, que participa en la liberación de proteínas antimicrobianas a la vacuola

(Spano & Galán, 2012). Se cree que en los macrófagos humanos, *S. Typhi* contrarresta esta vía a través de un mecanismo dependiente de T3SS1 (Baldassarre et al., 2021).

Se estima que de las personas infectadas con *S. Typhi* y que se recuperan de la enfermedad, entre el 2% y el 5% progresan a un estado de portador asintomático, donde *S. Typhi* persiste en la vesícula biliar y se expulsa intermitentemente en las heces (John et al., 2014). La bilis también induce una regulación positiva de los genes de SPI-1, lo que aumenta la invasión del epitelio de la vesícula biliar (Byrne et al., 2018).

Los cálculos biliares son un importante factor de riesgo de portabilidad crónica y afectan aproximadamente al 90% de los portadores (Lovane et al., 2016). *S. Typhi* forma biopelículas en la superficie de los cálculos biliares, dando lugar a una matriz celular espesa y poco compacta (Adcox et al., 2016). Las biopelículas se pueden visualizar directamente mediante microscopía electrónica en la superficie de los cálculos biliares de portadores humanos de *S. Typhi* y se cree que promueve la resistencia antimicrobiana (Crawford et al., 2010).

El diagnóstico definitivo de fiebre tifoidea requiere el aislamiento de *S. Typhi* de un lugar estéril, a nivel de sangre o médula ósea. El aislamiento a nivel de orina o heces únicamente se convierte en un elemento presuntivo dado que el aislamiento puede corresponder a un estado de portador crónico (Cárdenas, 2016).

Como se mencionó anteriormente, *S. Typhi* utiliza su arsenal genético para poder realizar una infección exitosa. Al respecto, *Salmonella enterica* contiene aproximadamente 4,8-4,9 millones de pares de bases con aproximadamente 4, 400-5,600 secuencias codificantes (Ilyas et al., 2017; Mandell et al., 2015). De ellos menos de 1000 genes están conservados en todos los aislados (Singh et al., 2016), lo que sugiere una larga historia de inserciones, deleciones y/o intercambio genético horizontal (Kidgell et al., 2002).

En este sentido, llama la atención la presencia de elementos genéticos presentes en el cromosoma o en plásmidos tales como el sistema CRISPR-Cas. Este sistema inmune adaptativo ha sido ampliamente utilizado para la tipificación de cepas de *Salmonella* (Shariat et al., 2015; Bachmann et al., 2014; Xie et al., 2017). Sin embargo, su papel funcional ha sido poco estudiado.

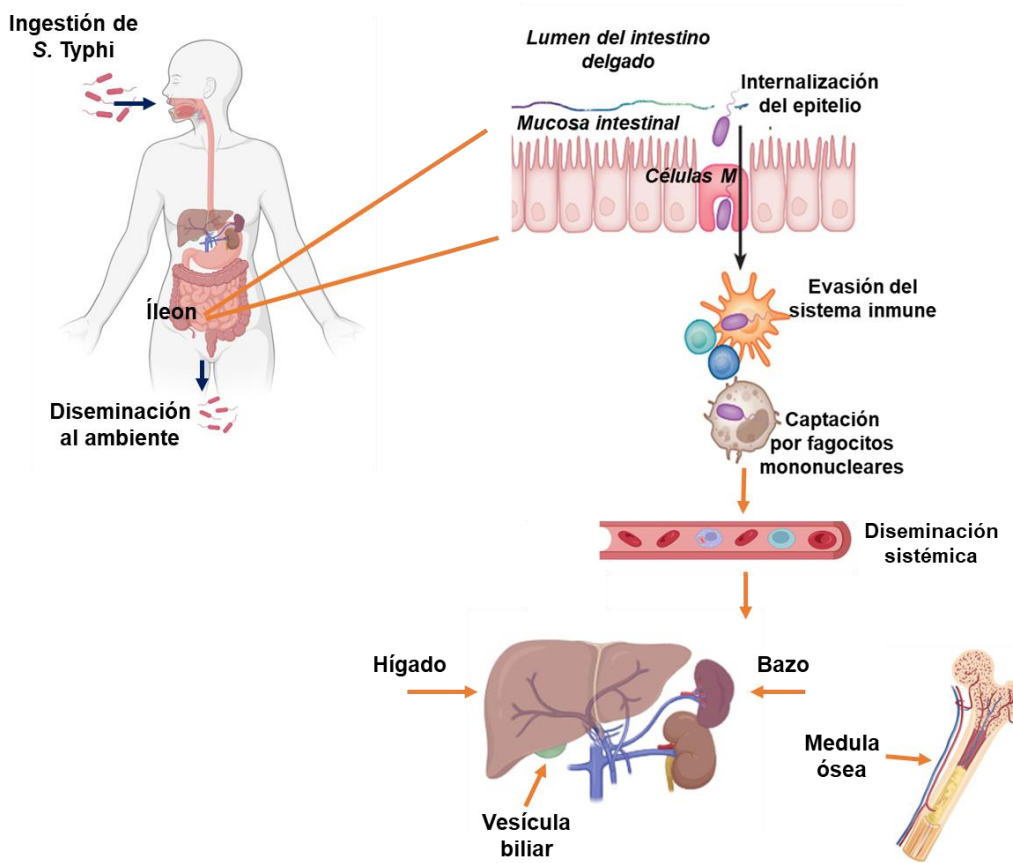


Figura 1. Infección por *Salmonella Typhi*. El proceso de infección de *S. Typhi* inicia en las células M del intestino delgado, posteriormente evade el sistema inmune y se internaliza a través de mecanismos regulados principalmente por genes presentes en SPI-1. Una vez que atraviesa las células epiteliales, la bacteria es fagocitada por células mononucleares que diseminan a *S. Typhi* al hígado y al bazo a través de la sangre y la linfa. En pacientes que se convierten en portadores crónicos, *S. Typhi* puede permanecer en la vesícula biliar y ser excretada mediante heces y orina, permitiendo a esta bacteria diseminarse al ambiente y volver a causar fiebre tifoidea.

CRISPR-Cas como sistema inmune adaptativo

CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) es un locus genético que se encuentra presente en el 85.2% de los genomas de arqueas y en el 42.3% de los genomas bacterianos secuenciados (Makarova et al., 2020).

Este locus está conformado por dos componentes: el operón *cas*, que contiene las regiones codificantes de las endonucleasas y otras proteínas de unión a ADN; y la región CRISPR, que está formada por secuencias palindrómicas repetidas (28-40 pb), separadas por secuencias denominadas “espaciadores” (29-72 pb) (Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005; Doudna & Charpentier, 2014).

Los sistemas CRISPR-Cas han sido descritos como sistemas de inmunidad adaptativa hereditaria, los cuales almacenan fragmentos cortos de ácido nucleico exógeno que sirven de memoria de infecciones pasadas. Cuando se presenta una reinfección las proteínas Cas son guiadas a sitios específicos del genoma, a través de las secuencias espaciadoras para la degradación de fagos y otros elementos genéticos móviles, como plásmidos y transposones (Barrangou et al., 2007; Marraffini & Sontheimer, 2010).

Actualmente los sistemas CRISPR-Cas se agrupan en dos clases, seis tipos y más de 30 subtipos (Koonin et al., 2017; Koonin & Makarova, 2019; Makarova et al., 2015). Si bien las proteínas específicas y los mecanismos moleculares varían, todos los sistemas CRISPR-Cas actúan a través de tres pasos generales como parte de la inmunidad adaptativa, estos pasos corresponden a la adaptación, expresión e interferencia (Figura 2) (Richter et al., 2012).

El sistema mejor caracterizado es el Tipo I-E presente en *E. coli*, cuyo mecanismo se describe a continuación (Figura 2).

1) Adaptación. Frente a la invasión por ADN foráneo, las proteínas Cas1 y Cas2 forman un complejo que reconoce un motivo de 2–4 pb conocido como PAM (Motivo adyacente al protoespaciador). Estas proteínas con actividad endonucleasa cortan el ADN invasor, liberando un segmento denominado protoespaciador, posteriormente lo integran en las secuencias CRISPR, generando un nuevo espaciador (Amitai & Sorek, 2016; Jackson et al., 2017). Finalmente, el clúster CRISPR es corregido por la maquinaria de reparación celular, lo que resulta en la duplicación de la primera repetida (Ivančić-Baće et al., 2015; Killelea & Bolt, 2017; Liu et al., 2017).

2) Expresión. En presencia de nuevos ataques del mismo invasor, se transcriben el operón *cas* y las secuencias CRISPR. En consecuencia, se genera una molécula de ARN

precursor que es sometida a un proceso de maduración mediante Cas6, esta proteína corta las secuencias repetidas en una región conservada ubicada 8 nucleótidos río arriba de cada espaciador, lo que da como resultado pequeñas moléculas de ARN CRISPR denominadas ARNcr (Hochstrasser & Doudna, 2015). Este ARNcr contiene dos remanentes de las secuencias repetidas, en el extremo 5' tiene 8 nucleótidos conocidos como "asa" o "etiqueta", mientras que en el extremo 3' tiene 21 nucleótidos que forman un patrón estructural en tallo-bucle. Así mismo, Cas6 permanece unida a esta horquilla en el extremo 3', esta conformación formada por el ARNcr más Cas6 es llamado ARNcr maduro. La biogénesis de los ARNcr es un paso crítico para el reconocimiento del ADN invasor (Jore et al. 2011; Hochstrasser & Doudna, 2015; Plagens et al., 2015).

Por otro lado, se expresan las proteínas Cas y se ensamblan en un complejo proteico denominado Cascade (Complejo asociado a CRISPR para la defensa antiviral), compuesto por (Cse1)₁-(Cse2)₂-(Cas5)₁-(Cas7)₆-(Cas6e)₁, las cuales son reclutadas por Cas6 para unirse al ARNcr. En el extremo 5' del ARNcr también llamado "pie", se une Cas5, posteriormente seis copias de Cas7 se unen a la secuencia espaciadora (Brouns et al. 2008; Jore et al. 2011). Por último, se unen Cse1 y un dímero de Cse2, que participan en la reconocimiento y unión al ADN invasor (Plagens et al., 2015).

3) Interferencia. El complejo Cascade utiliza la homología de la secuencia espaciadora presente en el ARNcr, para reconocer secuencias complementarias que poseen un motivo PAM en el genoma viral. Posteriormente el ARNcr híbrida con el material genético diana resultando en el desplazamiento de la hebra de ADN no complementaria. Finalmente, ambas cadenas sencillas son degradadas por la nucleasa Cas3 que es reclutada por el complejo Cascade tras la unión al objetivo (Nishimasu & Nureki, 2017; Plagens et al., 2015).

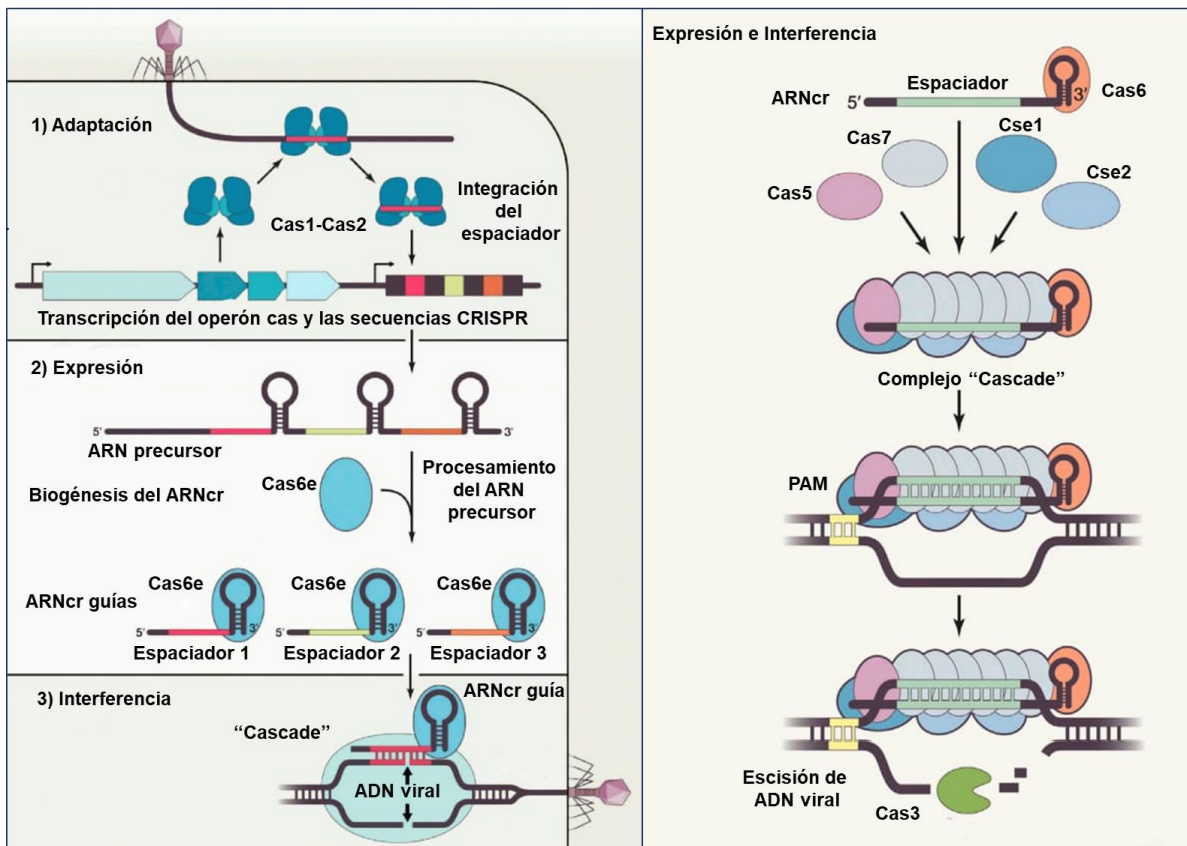


Figura 2. Sistema inmunológico CRISPR-Cas Tipo I-E presente en *E. coli*. Etapas del mecanismo de acción. 1) *Adaptación*. Cas1 y Cas2, cortan e incorporan DNA viral en las secuencias CRISPR (Amitai & Sorek, 2016). 2) *Expresión*. Frente al ataque del mismo invasor se transcriben los genes *cas* y las secuencias CRISPR. Posteriormente, se lleva a cabo la biogénesis de los ARNcr, que contienen estructuras de tallo-bucle que son reconocidas por Cas6e generando el ARNcr maduro. A continuación, las proteínas Cas5, Cas 7, Cse1 y Cse2, forman el complejo multienzimático Cascade, que se une al ARNcr (Hochstrasser & Doudna, 2015). 3) *Interferencia*. El complejo Cascade utiliza la homología del ARNcr, para reconocer y destruir material genético foráneo a través del reclutamiento de Cas3 (Plagens et al., 2015) (Modificado de Hille et al. 2018).

CRISPR-Cas participa en distintos procesos biológicos

Diversos patógenos humanos poseen un sistema CRISPR-Cas, que además de su papel en la defensa contra elementos genéticos móviles, pueden estar asociados con múltiples eventos de regulación genética (Cui et al., 2020; Faure et al., 2019; Newsom et al., 2021; Louwen et al., 2014).

Varias líneas de investigación han estudiado factores asociados a la expresión de CRISPR-Cas. Por ejemplo, una cepa mutante en la proteína reguladora de adaptación al estrés RelA provoca una disminución en la expresión de genes *cas* en *Enterococcus faecalis* V583, de igual manera una cepa mutante en OmpR provoca una disminución en la expresión de genes *cas* en *Yersinia pestis* 201 (Gao et al., 2019), así mismo, en *Escherichia coli*, BaeSR, modula la expresión de genes *cas* como respuesta al estrés de la envoltura celular (Perez-Rodriguez et al., 2011).

Debido a lo anterior, distintos trabajos han realizado análisis genómicos para esclarecer el papel biológico de los sistemas CRISPR-Cas en distintas bacterias de interés médico, debido a su posible participación en la regulación de la expresión de genes que codifican factores de virulencia (Newsom et al., 2021).

La mayoría de estos trabajos se basan en la generación de cepas mutantes de los genes *cas*, por lo que, únicamente se observa el fenotipo asociado a la pérdida de las proteínas asociadas a CRISPR. Por ejemplo, en patógenos como *Neisseria meningitidis* y *Campylobacter jejuni* la proteína Cas9 es necesaria para adherirse, invadir y replicarse dentro de las células epiteliales (Louwen et al., 2013; Sampson & Weiss, 2013; Shabbir et al., 2018). Mientras que en *Pseudomonas aeruginosa* PA14, Cas9 desempeña un papel en la modulación de la formación de biopelículas (Cady & O'Toole, 2011; Zegans et al., 2009).

En *Streptococcus pyogenes* GAS-M1T1-5448, la eliminación de Cas9 se asocia con una reducción significativa en su capacidad para adherirse a las células epiteliales debido a una disminución en la expresión del sistema de dos componentes FasA/FasB (Gao et al., 2019; Sarkar & Sumby, 2017).

En *Streptococcus mutans* UA159, una cepa mutante en los genes *cas* de sus sistemas CRISP1 y CRISPR2 muestra una menor tolerancia al estrés oxidativo y al choque térmico (Serbanescu et al., 2015).

A su vez, además de Cas9, la endonucleasa Cas2 ha sido implicada en la capacidad de *Legionella pneumophila* para sobrevivir dentro de amebas. Sin embargo, se desconoce

cómo Cas2 media la supervivencia intracelular de esta bacteria (Gunderson & Cianciotto, 2015).

Por su parte, en *Salmonella* Enteritidis SE211, un estudio transcriptómico reveló que en una cepa mutante en Cas3 se sobreexpresan los genes *IsrF*, *IsrG*, *IsrB*, *IsrE* involucrados en la detección de quórum (QS). Así mismo, genes involucrados con la expresión de fimbrias como *safA*, *safB*, *safC* y *safD*, disminuyen su expresión (Cui et al., 2020).

Si bien el estudio las proteínas Cas ha permitido dilucidar mecanismos de regulación alternativa a su papel inmunológico, el estudio de las secuencias CRISPR también ha revelado la presencia de espaciadores que tienen homología con el genoma bacteriano y que no están potencialmente relacionados con secuencias virales (Makarova et al., 2020; Rauch et al., 2017; Stern et al., 2010; Watters et al., 2018; Wimmer & Beisel, 2020; Zhang et al., 2018).

Un ejemplo de la funcionalidad de los espaciadores, lo podemos observar en *Clostridium tetani* en donde un ARNcr regula un gen hipotético involucrado en la biosíntesis de la capa S, que son proteínas que permiten a las bacterias adherirse a las células del huésped u otras superficies ambientales, manteniendo la forma y la rigidez de la envoltura celular (Jorth & Whiteley, 2012; Stern et al., 2010, Fagan & Fairweather, 2014).

Además de sistemas CRISPR-Cas que tienen como blanco secuencias de ADN, hasta la fecha se ha demostrado que existen sistemas de tipo I, II, III y VI que también actúan reconociendo secuencias de ARN. En estos casos, se especula que los espaciadores darían como resultado la degradación de ARNm y la modulación de la expresión génica (Abudayyeh et al., 2016; Dugar et al., 2018; Hale et al., 2009, 2012; Li et al., 2016; O'Connell et al., 2014; Rousseau et al., 2018; Samai et al., 2015; Strutt et al., 2018).

Por ejemplo, un estudio realizado en *Myxococcus xanthus* DK1622, demostró que la inserción de un transposón en el decimotercer espaciador de las secuencias CRISPR3 afectó negativamente el desarrollo del cuerpo fructífero y la producción de exopolisacáridos. Debido a que se ha demostrado que el sistema CRISPR-Cas de tipo IIIB se dirige al ARN en lugar del ADN, estos autores proponen que uno o más de los ARNcr resultantes de CRISPR3, podrían apuntar a los transcritos de genes involucrados

en la regulación de estos procesos, sin embargo, este mecanismo aún no se ha establecido por completo (Wallace et al., 2014).

Otro ejemplo de sistemas CRISPR-Cas que están involucrados en la regulación de ARNm de genes cromosómicos, ocurre en *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14, en la cual se ha demostrado que Cas 3 se une directamente al ARNm de *glpF*, y que en ausencia de Cas 3, los niveles del transcrito de *glpF* aumentan (Lin, 2019).

En *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14, también se sabe que un espaciador dentro de sus secuencias CRISPR1 tiene complementariedad con el transcrito del gen *lasR*, un regulador de quórum bacteriano. Esta complementariedad provoca que el ARNcr hibride con el ARNm de *lasR* para su degradación. La regulación negativa de *lasR* evita el reconocimiento por TLR4, lo que conduce a la evasión del sistema inmune (Li et al., 2016).

En *Francisella novicida* un pequeño ARN híbrida con un ARNtracr (ARN CRISPR transactivante), dirigiendo a Cas9 al ARNm de *FTN_1103* que codifica una lipoproteína bacteriana (BLP). Dado que las BLP son ligandos para TLR2, la represión de la expresión de este gen ayuda a facilitar la evasión de la respuesta inmune (Ratner et al., 2019).

Así mismo, en otros patógenos como *Streptococcus agalactiae* GD201008-001, la proteína Cas9 degrada el ARNm de *regR*, debido a la unión de un ARNcr que tiene homología con la secuencia de este gen, el cual codifica para un regulador transcripcional que media la represión de la hialuronidasa, la cual es un factor crítico para la apertura de la barrera hematoencefálica (BHE) y en consecuencia causar meningitis en ratones (Ma et al., 2018).

Antecedentes

CRISPR-Cas en *S. Typhi* IMSS-1

Datos de nuestro laboratorio han demostrado que *S. Typhi* IMSS-1, una cepa clínica que causa fiebre tifoidea posee un sistema CRISPR-Cas tipo I-E. Este sistema está compuesto por una región reguladora 5' (RR), ocho genes (*cas3* y *cse1-cse2-cas7-cas5-cas6e-cas1-cas2*), una secuencia líder de 84 pb rica en A/T y las secuencias CRISPR, que contienen siete secuencias repetidas de 29 pb y seis espaciadores de 32 pb (Figura 3) (Medina-Aparicio et al., 2011).

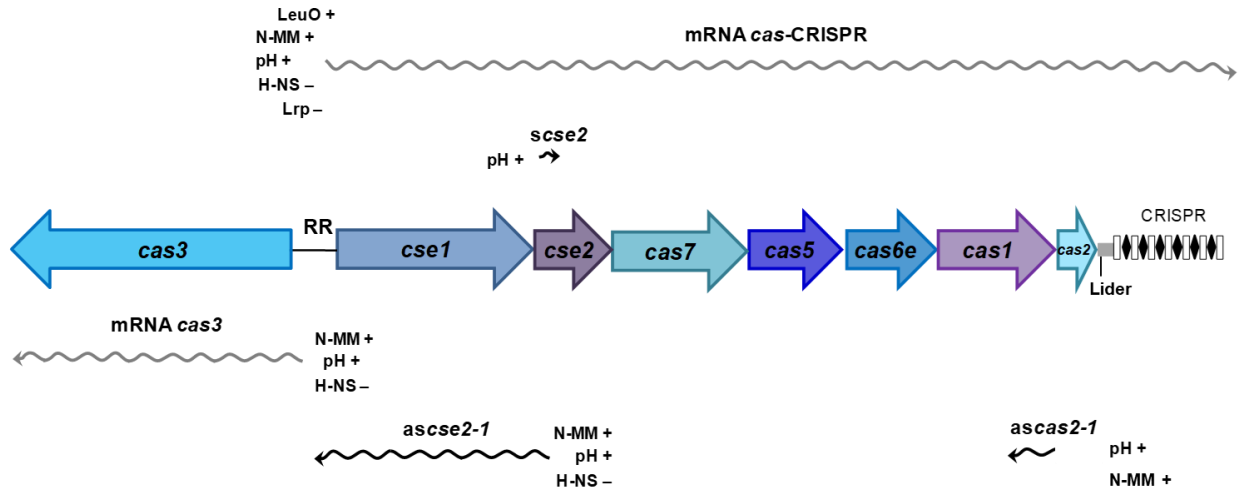


Figura 3. Organización transcripcional y elementos implicados en la regulación del sistema CRISPR-Cas de *S. Typhi* IMSS-1. Se representan los ARNm *cas3* y el operón *cas-CRISPR*, ARNs *scse2*, *ascse2-1* y *ascas2-1*. Además, se muestran los elementos implicados en la regulación positiva (+) y negativa (-) de cada una de las unidades transcripcionales. Modificado de (Medina-Aparicio et al., 2017).

Este locus contiene cinco unidades transcripcionales, dos de ellas se transcriben en la cadena sentido, la primera es un ARNm policistrónico que incluye los genes *cse1-cse2-cas7-cas5-cas6e-cas1-cas2* y las secuencias CRISPR. Esta unidad es inducida por

LeuO y regulada negativamente por H-NS y Lrp. La segunda es un ARN pequeño presente en la región codificante de *cse2*. Así mismo existen dos ARN antisentido, el primero *cse2-1* (de *cse2* a *cse1*) y el segundo *cas2-1* (de *cas2* a *cas1*). Además, el gen *cas3* se transcribe como una unidad independiente divergente al operón *cas*-CRISPR. En adición, se ha demostrado que H-NS ejerce un control negativo sobre las unidades transcripcionales *cas3* y *ascse2-1* (Medina-Aparicio et al., 2011; Medina-Aparicio et al., 2017).

Ensayos sobre la regulación y las señales que inducen a este clúster genético han demostrado que CRISPR-Cas en *S. Typhi* IMSS-1 se sobreexpresa en medio mínimo N y en un pH de 7.5 (Medina-Aparicio et al., 2017). En contraste, una cepa deficiente del sistema CRISPR-Cas, disminuye su velocidad de crecimiento, en medio suplementado con desoxicolato de sodio 5% (Villarreal et al., 2014).

Además, en ausencia del clúster CRISPR-Cas la expresión de *ompC* y *ompF* se ve disminuida (Medina-Aparicio et al., 2021). Debido a que *cse2*, *cas6e*, *cas1* y *cas3* están involucrados en la regulación de OmpF, mientras que *cas5* y *cas2* están involucradas en la regulación de OmpC (Medina-Aparicio et al., 2021).

En trabajos recientes se demostró el papel de CRISPR-Cas sobre la regulación del promotor *ompRP1* para inducir la expresión de *ompR*, el cual codifica para el activador transcripcional de *ompC* y *ompF*. En el caso del promotor *ompRP1*, su actividad genética en cepas individuales deficientes de *cse2*, *cas5*, *cas6e*, *cas1*, *cas2* y *cas3* se redujo considerablemente (Medina-Aparicio et al., 2021).

Así mismo, trabajos previos de laboratorio han reportado que LeuO además de regular al sistema CRISPR-Cas, también es un regulador positivo de *ompS1* y *ompS2* (Hernández-Lucas et al., 2008). Dos porinas que se expresan en niveles muy bajos en relación con las porinas principales OmpC y OmpF, que son reguladas por el sistema de dos componentes EnvZ/OmpR (Rodríguez-Morales et al., 2006). Se ha reportado que OmpR se une a la región reguladora *ompS1* y *ompS2*, por lo que CRISPR-Cas podría estar involucrado en la regulación de otras proteínas de membrana a través de OmpR.

Hipótesis

En *Salmonella* Typhi IMSS-1 el sistema CRISPR-Cas podría estar involucrado en la regulación de otras proteínas de membrana externa además de OmpC y OmpF a través de OmpR.

Objetivos

Objetivo general

- Establecer la participación del sistema CRISPR-Cas en la regulación de OmpS2 en *S. Typhi* IMSS-1.

Objetivos particulares

- Determinar si la presencia de la proteína de membrana externa OmpS2 es dependiente de CRISPR-Cas en *S. Typhi* IMSS-1
- Establecer la red de regulación mediante la cual CRISPR-Cas regula las proteínas de membrana externa.
- Identificar si el papel del sistema CRISPR-Cas en la síntesis de proteínas de membrana externa se encuentra conservado en otras enterobacterias.

Material y Métodos

Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Tabla 1. Cepas bacterianas		
Cepa	Descripción	Referencia
S. Typhi IMSS-1	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi (Fórmula antigénica 9,12,Vi:d). Aislado clínico mexicano.	(Puente et al., 1987)
IMSS-1 Δ CRISPR-cas	S. Typhi IMSS-1 Δ cas-CRISPR	(Medina-Aparicio et al., 2017)
IMSS-1 + pFMTrc12	S. Typhi IMSS-1 conteniendo el plásmido pFMTrc12	(Hernández-Lucas et al., 2008)
IMSS-1 + pFMTrcleuO-50	S. Typhi IMSS-1 conteniendo el plásmido pFMTrcleuO-50	(Hernández-Lucas et al., 2008)
IMSS-1 Δ CRISPR-cas + pFMTrc12	S. Typhi IMSS-1 Δ CRISPR-cas conteniendo el plásmido pFMTrc12	En este estudio
IMSS-1 Δ CRISPR-cas + pFMTrcleuO-50	S. Typhi IMSS-1 Δ CRISPR-cas conteniendo el plásmido pFMTrcleuO-50	En este estudio
IMSS-1 Δ ompR	S. Typhi IMSS-1 Δ ompR	(Villarreal et al., 2014)
IMSS-1 Δ ompR + pFMTrc12	S. Typhi IMSS-1 Δ ompR conteniendo el plásmido pFMTrc12	En este estudio
IMSS-1 Δ ompR + pFMTrcleuO-50	S. Typhi IMSS-1 Δ ompR conteniendo el plásmido pFMTrcleuO-50	En este estudio
<i>E. coli</i> DH5 α	Φ 80d/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r $_{k}^{-}$ m $_{k}^{+}$) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 (Nal ^R) relA.	Gibco BRL
IMSS-1 Δ cas3	S. Typhi IMSS-1	(Medina-Aparicio et al., 2021)

	$\Delta cas3$	
IMSS-1 $\Delta cse1$	S. Typhi IMSS-1 $\Delta cse1$	(Medina-Aparicio et al., 2021)
IMSS-1 $\Delta cse2$	S. Typhi IMSS-1 $\Delta cse2$	(Medina-Aparicio et al., 2021)
IMSS-1 $\Delta cas7$	S. Typhi IMSS-1 $\Delta cas7$	(Medina-Aparicio et al., 2021)
IMSS-1 $\Delta cas5$	S. Typhi IMSS-1 $\Delta cas5$	(Medina-Aparicio et al., 2021)
IMSS-1 $\Delta cas6e$	S. Typhi IMSS-1 $\Delta cas6e$	(Medina-Aparicio et al., 2021)
IMSS-1 $\Delta cas1$	S. Typhi IMSS-1 $\Delta cas1$	(Medina-Aparicio et al., 2021)
IMSS-1 $\Delta cse2$	S. Typhi IMSS-1 $\Delta cse2$	(Medina-Aparicio et al., 2021)
IMSS-1 $\Delta cas7$	S. Typhi IMSS-1 $\Delta cas7$	(Medina-Aparicio et al., 2021)
IMSS-1 $\Delta cas5$	S. Typhi IMSS-1 $\Delta cas5$	(Medina-Aparicio et al., 2021)
IMSS-1 $\Delta cas6e$	S. Typhi IMSS-1 $\Delta cas6e$	(Medina-Aparicio et al., 2021)
IMSS-1 $\Delta cas1$	S. Typhi IMSS-1 $\Delta cas1$	(Medina-Aparicio et al., 2021)
IMSS-1 $\Delta cas2$	S. Typhi IMSS-1 $\Delta cas2$	(Medina-Aparicio et al., 2021)

Las cepas se cultivaron en medio LB (1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura y 1% de NaCl, pH 7.4) a 37°C bajo condiciones aeróbicas. S. Typhi también fue cultivada en medio rico MA (7 g de caldo nutritivo, 1 g de extracto de levadura, 2 ml de glicerol, 3.75 g de K₂HPO₄ y 1.3 g de KH₂PO₄ por litro) (Kawaji et al., 1979) y medio mínimo-N (N-MM)

[KCl 5 mM, (NH₄)₂SO₄ 7.5 mM, K₂SO₄ 0.5 mM, KH₂PO₄ 1 mM, MgCl₂ 200 μM, glicerol 0.5%, casaminoácidos 1% y Tris-HCl (pH 7.5) 100 mM] (Deiwick et al., 1999).

Manipulación de ADN

El ADN cromosómico de las cepas se aisló mediante el estuche comercial “Promega, Madison”. Las enzimas de restricción, ligasas, polimerasas y nucleótidos se obtuvieron de las compañías New England Biolabs, Invitrogen, Stratagene y Thermo Scientific. Los plásmidos y productos de PCR fueron purificados con “High Pure Plasmid Isolation Kit” y “High Pure PCR Purification Kit” (Roche Applied Science, Germany), respectivamente. Las muestras de ADN fueron secuenciadas con el sistema Perkin Elmer/Applied Biosystems 377-18 en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología (UNAM).

Construcción de fusiones transcripcionales

Los plásmidos recombinantes se transformaron por choque térmico en células *E. coli* DH5α, se seleccionaron las clonas por la resistencia al antibiótico correspondiente. Los plásmidos fueron purificados y posteriormente secuenciados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (UNAM). Cada fusión transcripcional fue transformada en las cepas correspondientes de *S. Typhi* IMSS-1 para realizar cinéticas de expresión y determinar actividad específica de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT).

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este estudio		
Plásmido	Descripción	Referencia
pKD4	Derivado de pANTS© conteniendo secuencias FRT adyacentes al gen de resistencia a kanamicina. Km ^R .	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD46	Sistema de recombinasa λ Red bajo el promotor inducible por arabinosa, Ap ^R .	(Datsenko & Wanner, 2000)

pFM <i>Trc</i> 12	Derivado de p <i>Trc</i> 99A que contiene el origen de replicación p15A1, Ap ^R .	(Hernández-Lucas et al., 2008)
pFM <i>Trc</i> leuO-50	pFM <i>Trc</i> 12 derivative containing serovar Typhi <i>leuO</i> gene, behind an IPTG inducible <i>P_{trc}</i> promoter, Ap ^R .	(Hernández-Lucas et al., 2008)
pKK232-8	Derivado del pBR322 con el gen cloranfenicol acetiltransferasa (<i>cat</i>) sin promotor, Ap ^R .	Pharmacia LKB Biotechnology
pKK232-9	Derivado del pKK232-8, con el gen de kanamicina obtenido del pUC4K, clonado <i>Pst</i> I, Km ^R .	(Hernández-Lucas et al., 2008)
pKK9/ <i>ompS</i> 1-706+60	pKK232-9 conteniendo 706-pb corriente arriba y 60-bp corriente abajo del ATG de <i>ompS</i> 1, Km ^R .	(Hernández-Lucas et al., 2008)
pKK9/ <i>ompS</i> 2-482+77	pKK232-9 conteniendo 482- pb corriente arriba y 77-bp corriente abajo del ATG de <i>ompS</i> 2, Km ^R .	(Hernández-Lucas et al., 2008)
pKK9/ <i>ompC</i> -772+27	pKK232-9 conteniendo 772-pb corriente arriba y 27-bp corriente abajo del ATG de <i>ompC</i> , Km ^R .	(Hernández-Lucas et al., 2008)
pKK8/ <i>ompF</i> -782+184	pKK232-8 conteniendo 782 pb corriente arriba y 184 pb corriente abajo del ATG de <i>ompF</i> , Ap ^R .	(Villarreal et al., 2014)
pKK8/ <i>ompR</i> -383+317	pKK232-8 conteniendo 383 pb corriente arriba y 317 pb corriente abajo del ATG de <i>ompR</i> , Ap ^R .	(Villarreal et al., 2014)
pKK8/ <i>ompR</i> -134-1 (P1)	pKK232-8 conteniendo 134 pb corriente arriba y -1 bp corriente abajo del ATG de <i>ompR</i> ATG, Ap ^R .	(Villarreal et al., 2014)
pKK8/ <i>ompR</i> -383-133 (P2)	pKK232-8 conteniendo los nucleótidos de -383 a -133 con respect al ATG de <i>ompR</i> , Ap ^R .	(Villarreal et al., 2014)

Ensayos de actividad específica CAT

Las cepas fueron cultivadas en 5 ml de medio LB durante 16 h a 37°C, 0.5 ml de estos preinóculos fueron utilizados para inocular 100 ml de medio nutritivo MA por duplicado, con o sin 50 µM de IPTG, según corresponda. En el caso de medio mínimo N, 3 ml de un cultivo de 16 h a 37°C de las cepas a evaluar, fueron centrifugados, lavados e inoculados en matraces conteniendo 50 ml de dicho medio. Los matraces se incubaron a 37°C, 200 rpm. Se tomaron 1.5 ml de los cultivos de una OD_(595nm) de 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2. Las muestras se centrifugaron y lavaron con TDDT (Tris-HCl 50 mM, pH 7.8 y DL-Ditiotreitol 30 µM) resuspendiéndolas en 0.6 ml de este reactivo. Posteriormente, se sometieron a sonicación 3 min (pulsos de 9.9 s ON - 9.9 s OFF) y fueron centrifugadas 15 min a 12,000 rpm posteriormente se transfirió el sobrenadante a tubos eppendorf limpios. Con el sobrenadante se realizó la determinación de proteínas totales y actividad de CAT. Las proteínas totales fueron cuantificadas por el método espectrofotométrico utilizando el BCA Protein Assay Kit Reagent, 10 µl de cada muestra fueron colocados por duplicado en una placa de ELISA de 96 pozos, agregando 200 µl de la mezcla de reacción del kit. Las placas se incubaron 30 min a 37°C y se midió la concentración de proteínas en un lector Ceres 900-C (Bio-Tek Instruments Inc.). Las proteínas de la muestra reducen el Cu²⁺ que interacciona con el BCA (Ácido bicinconínico) formando un compuesto colorimétrico detectable a 562 nm. La actividad de CAT se determinó colocando por duplicado 5 µl de cada extracto en una placa de ELISA de 96 pozos (Costar) y agregando 200 µl de una mezcla conteniendo 1 mM de DNTB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico), 0.1 mM de acetil-coenzima A (acetil-CoA) y 0.1 mM de cloranfenicol, los tres componentes disueltos en Tris-HCl, pH 7.8 al 0.1 M. La absorbancia se midió a 412 nm cada 5 s durante 5 minutos utilizando el lector Ceres. La enzima CAT transfiere el grupo acetilo de la acetil-CoA al cloranfenicol inactivándolo y el CoA reducido (CoA-SH) reacciona con el DNTB produciendo disulfuro de CoA, ácido tionitrobenzoico y un equivalente molar de 5-tio-2-nitrobenzoato, compuesto que absorbe a una longitud de 412 nm. Una unidad de CAT equivale a 1 µmol de cloranfenicol acetilado por minuto. Finalmente, la actividad específica CAT se obtuvo a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Promedio CAT}}{[\text{Proteínas}]} \quad (\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1})$$

Purificación de ARN

La purificación de ARN total para los experimentos de microarreglos se realizó por el método de fenol-ácido. Las cepas bacterianas *S. Typhi* IMSS-1 y *S. Typhi* IMSS-1 Δ CRISPR-cas fueron inoculadas en 50 ml de MM-N a 37°C, a 200 rpm. Posteriormente 20 ml de cultivo fueron colectados a una OD_{595nm}:1.0. Las muestras se centrifugaron a 7,000 rpm por 5 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en 1 ml de solución A (SDS al 0.5%, acetato de sodio pH 4.8, 20 mM y EDTA pH 8, 10 mM), y se dividió en dos tubos Eppendorf. Después las muestras se vortexearon vigorosamente y se añadieron 0.5 ml de fenol-ácido a 65°C, se agitó por 15 s en vortex y se incubó a 65°C por 10 min. Posteriormente, se centrifugaron 12 min a 12,000 rpm, la fase acuosa fue transferida a un tubo Eppendorf y se adicioneo 1 ml de etanol absoluto, posteriormente se centrifugó 5 min a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y al precipitado obtenido se le agregó 1 ml de etanol al 70% y nuevamente se centrifugó 2 min 30 seg a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 0.4 ml de la solución A. Después, 0.5 ml de fenol-ácido fueron adicionados y se agitó vigorosamente, se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm y la fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf para agregar 0.4 ml de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vortex y se centrifugó 10 min a 13,000 rpm. La fase acuosa fue colocada en un tubo Eppendorf y se adicionó 1 ml de etanol absoluto. La mezcla fue centrifugada 5 min a 13,000 rpm, el etanol fue decantado y se añadió 1 ml de etanol al 70%. Posteriormente, se centrifugó por 2 min 30 seg a 13,000 rpm y se retiró el etanol con la ayuda de una micropipeta. El precipitado se secó a temperatura ambiente y posteriormente al vacío por 10 min en el equipo SpeedVac SC100 (Savant). Por último, las muestras se resuspendieron en 50 μ l de H₂O libre de ARNasas, se juntaron los duplicados y se les adicioneo 20 U de inhibidor de ARNasa (Ribolock, Thermo Scientific). La cuantificación de ARN obtenido se realizó a 260 nm y la integridad fue observada en un gel de agarosa al 1.5 %/TAE 1X.

Análisis de microarreglos

El análisis de microarreglos fue realizado en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el software genArise desarrollado en la unidad de cómputo del departamento de Bioquímica y Biología Molecular encabezado por el Dr. Jorge Ramírez Salcedo. Los chips utilizados contienen 12, 288 spots y cada sonda está expuesta por duplicado. Los genomas utilizados son *Salmonella* Typhimurium LT2, CT18 y sus respectivos plásmidos pSC101, pR27, pSLT, pHCM1 y pHCM2. Este software identifica genes diferencialmente expresados, calculando un Z-score dependiendo de la intensidad. La metodología puede consultarse en el capítulo de libro “Microarreglos de ADN: fabricación, proceso y análisis” https://www.researchgate.net/publication/296695965_Microarreglos_de_DNA_Fabricacion_Proceso_y_Analisis.

Purificación y electroforesis de proteínas de membrana externa

La purificación de proteínas de membrana externa se realizó a partir de las cepas *S. Typhi* IMSS-1 y *S. Typhi* IMSS-1 Δ CRISPR-cas. Como preinóculo se creció cada cepa en 5 ml de medio LB en tubos de ensayo durante 14 h a 37°C, 200 rpm. Tres ml del preinóculo fueron centrifugados a 7,000 rpm durante 5 min y la pastilla se lavó agregando 0.9 ml de MM-N. Después de centrifugar 5 min a 7,000 rpm, se desechó el sobrenadante, el paquete celular se resuspendió en 0.5 ml de MM-N para inocular matraces de 250 ml conteniendo 50 ml del medio mencionado. Cada cultivo se mantuvo a 37°C/200 rpm hasta una OD_{595nm} de 0.6 ó 1.3. Posteriormente, se colectaron 15 ml de cada cultivo y se centrifugaron 8 min/7,000 rpm/4°C. Las pastillas se resuspendieron en 1 ml de Na₂HPO₄ 10 mM (pH 7.2) y se centrifugaron 2 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 0.6 ml de Na₂HPO₄ 10 mM (pH 7.2). Los homogenizados se sometieron a sonicación durante 9 min en el equipo Sonipred 150 con pulsos de 9.9 s y 4.5 s de reposo, y se centrifugaron 2 min a 12000 rpm. El sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo Eppendorf y se centrifugó 1 h a 12000 rpm, 4°C. El sobrenadante fue desechado, las proteínas de membrana se solubilizaron en 0.5 ml de Na₂HPO₄ 10 mM (pH 7.2) /Triton X-100 al 2% y se incubaron a 37°C por 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó 1 h/12000 rpm/4°C, el sobrenadante se eliminó y la pastilla se lavó con 0.5 ml de Na₂HPO₄ 10 mM (pH 7.2).

Posteriormente se centrifugó 1 h/12000 rpm/4°C, se desechó el sobrenadante y finalmente las proteínas se resuspendieron en 50 µl de PBS (Buffer Salino de Fosfatos) 1X, pH 7.4. La concentración de proteínas fue calculada con el estuche BCA Protein Assay Reagent, 15 µg de cada muestra fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida 12% SDS-PAGE. La electroforesis de los geles se realizó a un voltaje de 15 mA durante 16 horas. El tamaño de los geles fue de 21.5cm x 16.3 cm x 1.5 cm. Las proteínas de membrana externa se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie (Washburn et al., 2001)

Preparación de extractos proteicos para electroforesis en gel bidimensional

Se cultivaron 100 ml de *S. Typhi* IMSS-1 y *S. Typhi* ΔCRISPR-cas que albergaba el plásmido pFM*TrcleuO*-50 en medio MA, suplementado con ampicilina e IPTG (50 µM) hasta una densidad óptica de 0.6 a 595 nm (OD₅₉₅). Posteriormente los cultivos de *S. Typhi* IMSS-1 y *S. Typhi* ΔCRISPR-cas fueron centrifugados a 7,000 rpm durante 5 min y las pastillas se lavaron con 20 ml de PBS 1X. Las proteínas celulares se obtuvieron mediante sonicación a 24 kHz durante 1 min en la posición de encendido y 1 min en la posición de apagado, durante cinco ciclos a 4°C utilizando un Vibra Cell (Sonics, Estados Unidos), en presencia de un inhibidor de proteasas (Tabletas completas; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Para limitar aún más la proteólisis, el aislamiento de proteínas se realizó mediante extracción con fenol (Hurkman y Tanaka, 1986; Encarnación et al., 2005). Antes de la electroforesis, las muestras se mezclaron con urea 7 M, tiourea 2 M, 4% 3-[(3-colamidopropilo)-dimetil amonio]-1-propano sulfonato (CHAPS; Roche Diagnostics GmbH, Alemania), tributilfosfina 2 mM, anfolitos al 2% y ditiotretitol 60 mM. Los métodos utilizados para la electroforesis analítica en gel bidimensional (2-DGE) y análisis de imágenes se han descrito previamente (Encarnación et al., 2005). Los gradientes de pH se determinaron usando un estándar de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio bidimensional (Sigma, Estados Unidos). Para el enfoque isoeléctrico, se cargaron 500 µg de proteínas totales. Todos los experimentos de gel se repitieron al menos dos veces.

Western Blot

Para los experimentos de transferencia Western Blot, la cepa *S. Typhi* IMSS-1 y *S. Typhi* Δ CRISPR-cas se cultivaron en MM-N a una OD_{595nm} :1.0 o medio MA hasta una OD_{595nm} :0.6. Los cultivos se adicionaron, cuando fue necesario, con ampicilina e IPTG (50 μ M). Se recuperaron 15 ml de cada cultivo y fueron centrifugados a 7,000 rpm durante 5 min. Las pastillas se suspendieron en 600 μ l de PBS 1X y se sometieron a sonicación durante 12 min a intervalos de 10 s con 5 s de reposo. La concentración de proteína total se determinó mediante el ensayo BCA Protein Assay Reagent (Thermo) y se cargaron 80 μ g de cada muestra en un gel de poliacrilamida SDS al 10%. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno con un tamaño de poro de 0.45 μ m utilizando el sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad) (Guadarrama et al., 2014). Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 10% y se incubaron con anticuerpos policlonales anti-OmpR o anti-GroEL (StressGen). Posteriormente, se lavaron con PBS 1X, 0.1% Tween 20. La inmunodetección se realizó con una dilución 1: 10,000 de anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante para anticuerpos policlonales, y el kit de reactivos de quimioluminiscencia Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer). Las membranas que contienen las proteínas se expusieron a películas Carestream X-OMAT LS.

Resultados

Elementos genéticos del sistema CRISPR-Cas involucrados en la expresión de OmpR en *S. Typhi* IMSS-1

En *S. Typhi* IMSS-1 la ausencia de CRISPR-Cas reduce la actividad transcripcional del promotor *ompRP1* y la actividad transcripcional de *ompC* se abate totalmente (Medina-Aparicio et al., 2021). Para determinar si la disminución en la actividad de *ompRP1* en la cepa Δ CRISPR-*cas* impide la síntesis de la proteína OmpR se realizó un Western-Blot, así mismo, se incluyeron mutantes individuales de los genes *cas* para determinar el elemento genético específico involucrado en la regulación de la expresión de OmpR. Los resultados indican que los genes *cas3*, *cse2*, *cas5*, *cas6e*, *cas1* y *cas2* están involucrados en la regulación positiva de OmpR (Figura 4).

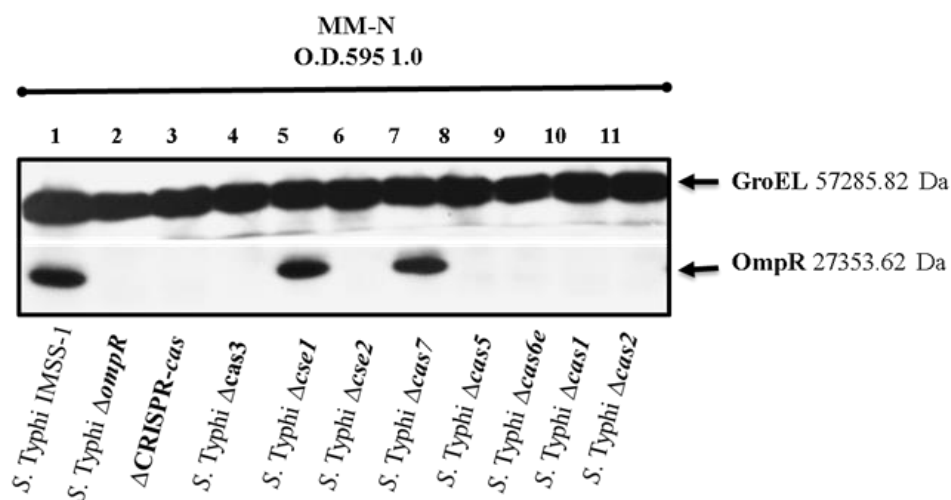


Figura 4. Los genes *cas3*, *cse2*, *cas6e*, *cas1* y *cas2* regulan positivamente a OmpR.

S. Typhi IMSS-1 (carril 1), Δ *ompR* (carril 2), Δ CRISPR-*cas* (carril 3), Δ *cas3* (carril 4), Δ *cse1* (carril 5), Δ *cse2* (carril 6), Δ *cas7* (carril 7), Δ *cas5* (carril 8), Δ *cas6e* (carril 9), Δ *cas1* (carril 10), Δ *cas2* (carril 11). El Western Blot fue realizado con cepas crecidas en MM-N pH 7.5, a una OD_{595nm} de 1.

CRISPR-Cas está involucrado en la regulación positiva de *ompS2* en *S. Typhi* IMSS-1

Para identificar genes dependientes del sistema CRISPR-Cas se realizó un estudio de microarreglos. En dicho experimento se hizo un análisis comparativo entre una cepa *S. Typhi* IMSS-1 y una mutante del sistema CRISPR-Cas. Los cultivos fueron crecidos en MM-N, pH 7.5 a una OD_{595nm} de 1, condiciones en las cuales se ha visto que el sistema CRISPR-Cas alcanza sus niveles más altos de expresión (Medina-Aparicio et al., 2017).

Los resultados obtenidos mostraron que, en ausencia del sistema CRISPR-Cas, 94 genes disminuyeron sus niveles de expresión, mientras que 158 genes aumentaron sus niveles de expresión (Anexo 1). Los datos obtenidos de los microarreglos fueron evaluados de manera que se identificaron 16 reguladores transcripcionales que se expresaron diferencialmente en la cepa mutante de CRISPR-Cas (Anexo 2). Como dato interesante, en el Anexo 3 se muestran los resultados de *STY4468*, que es un regulador tipo LysR, que se regula positivamente en ausencia de CRISPR-Cas (Anexo 2), y que en una cepa mutante de este gen, la proteína OmpR desaparece (Figura 12). Así mismo, aunque OmpR no está presente, OmpF no desaparece en un gel de proteínas de membrana externa (Figura 11). Diversos estudios sobre estos genes hacen falta y se proponen como perspectivas del trabajo.

Debido a los objetivos del proyecto, a continuación se presentan únicamente los genes que de acuerdo con su clasificación funcional, codifican para proteínas de membrana (Tabla 2). Los resultados obtenidos mostraron que 20 genes aumentan sus niveles de expresión y 18 disminuyen sus niveles de expresión en ausencia de CRISPR-Cas. Entre ellas OmpS, una proteína de membrana externa, con la que previamente se ha trabajado dentro de nuestro grupo de estudio llamó la atención, debido a que en ausencia del sistema CRISPR-Cas, disminuyó su expresión (Zscore, -2).

Sin embargo, los resultados de los microarreglos no fueron concluyentes respecto a la identidad de esta proteína. Por lo tanto, hipotetizamos que tanto la proteína OmpS1, como OmpS2, al igual que OmpC y OmpF podían estar reguladas por CRISPR-Cas a través de OmpR en *S. Typhi* IMSS-1 .

Tabla 3. Genes que codifican proteínas de membrana y que se expresan diferencialmente en ausencia de CRISPR-Cas en S. Typhi IMSS-1

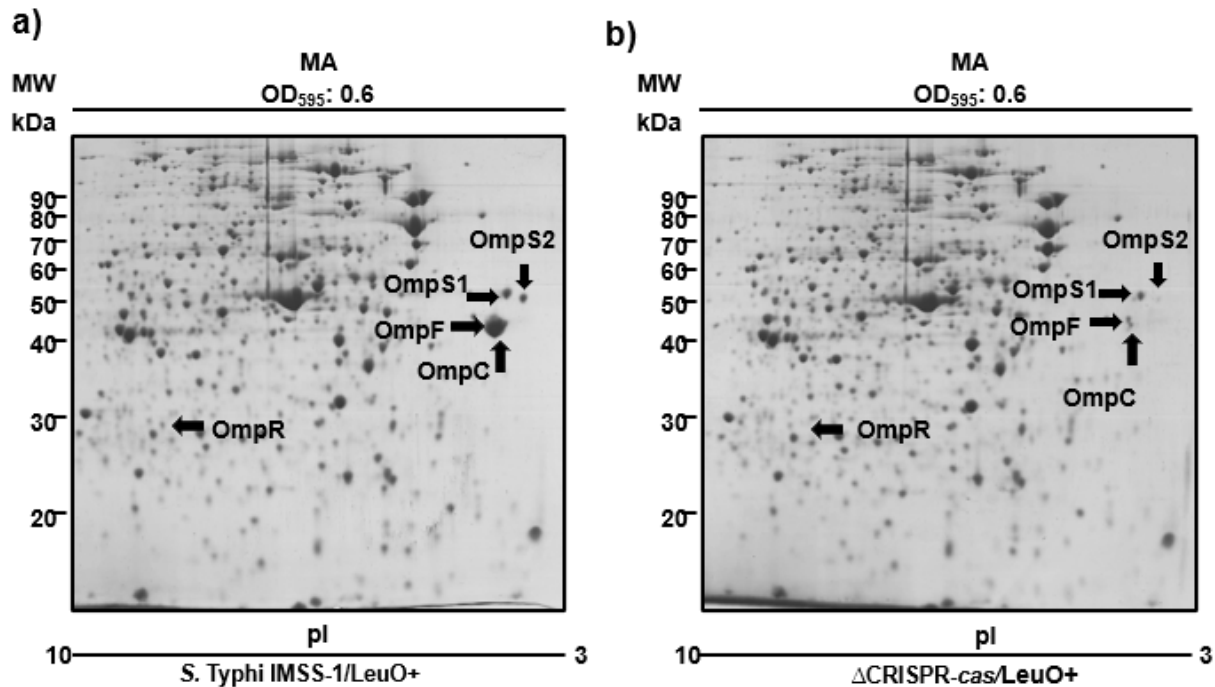
Genes regulados negativamente	Proteínas codificadas	Zscore	Genes regulados positivamente	Proteínas codificadas	Zscore
<i>yicL</i>	Permeasa	-5.876758	<i>dsbD</i>	Disulfuro reductasa	3.113731
<i>hisQ</i>	Permeasa transportadora de aminoácidos	-5.32441	<i>dcuA</i>	Transportador C4-dicarboxilato	2.700925
<i>lptC</i>	Exportador de lipopolisacáridos	-4.354445	<i>crcB</i>	Proteína de estrés universal	2.845889
<i>yiaN</i>	Permeasa transportadora de L-dehidroascorbato	-3.105688	<i>pstS</i>	Transportador de fosfato	2.591013
<i>cheV</i>	Proteína de quimiotaxis	-2.895191	<i>yrbE</i>	Permeasa	2.558795
<i>phsC</i>	Citocromo tiosulfato reductasa	-2.849657	<i>plsB</i>	glicerol-3-fosfato 1-O-aciltransferasa	2.557921
<i>tsr</i>	Proteína de quimiotaxis	-2.839477	<i>fliP</i>	Proteína para la biosíntesis flagelar	2.502802
<i>STY1040</i>	Proteína estructural de membrana	-2.677518	<i>yjgN</i>	Proteína de membrana interna	2.445115
<i>flhB</i>	Proteína para la biosíntesis flagelar	-2.579461	<i>znuC</i>	Transportador de alta afinidad de Zn	2.48472
<i>nar1</i>	Nitrato reductasa	-2.427849	<i>flhA</i>	Proteína para la biosíntesis flagelar	2.395661

<i>sohB</i>	Proteasa	-2.409798	<i>siD</i>	Proteína adaptadora periplásmica (PAP)	2.380254
<i>ugtL</i>	D-alanil-D-alanina dipeptidasa	-2.255454	<i>fliL</i>	Proteína asociada al cuerpo basal flagelar	2.371464
<i>yehM</i>	Transportador de sulfato	-2.205674	<i>menA</i>	Polipropileno-transferasa	2.28093
<i>secF</i>	Translocasa	-2.088307	<i>fliG</i>	Proteína para la biosíntesis flagelar	2.241458
STY0375	Proteína hipotética	-2.076722	<i>siC</i>	Proteína de membrana externa	2.182177
<i>ompS</i>	Porina de membrana externa S	-2.031502	<i>yfbS</i>	Permeasa	2.178332
STY1169	Transportador MFS	-2.01216	<i>rlpA</i>	Lipoproteína A	2.069953
STY3377	Proteína hipotética	-2.007069	<i>yhiH</i>	Transportador	2.056797
			<i>nuoA</i>	NADH Deshidrogenasa	2.016625
			<i>ycgO</i>	Antiportador K ⁺ /H ⁺	2.005821

Para validar los datos de microarreglos, cultivos de una cepa *S. Typhi* IMSS-1 y una cepa mutante del sistema CRISPR-Cas fueron crecidas en medio MA a una OD_{595nm}:0.6. Estas cepas contenían el plásmido pFM*TrcleuO*-50, para inducir de manera artificial a LeuO con 50 µM de IPTG, debido a que se sabe que en estas condiciones *ompS1* y *ompS2* alcanzan sus máximos niveles de expresión (Hernández-Lucas et al., 2008). En trabajos

previos se ha demostrado que la inducción del regulador transcripcional LeuO es necesaria para activar la transcripción de los genes *ompS1* y *ompS2*, los cuales codifican proteínas de membrana externa que comúnmente se expresan en niveles muy bajos y que necesitan de la regulación positiva de LeuO para aumentar su expresión. Así mismo, se sabe que OmpR está involucrado en la regulación positiva de manera directa de los promotores de *ompS1* y *ompS2* (Oropeza et al., 1999; De la Cruz et al., 2007; De la Cruz & Calva, 2010; Fernández-Mora et al., 1995; Fernández-Mora et al., 2004; Rodríguez-Morales et al., 2006; Hernández-Lucas et al., 2008; Moreno- Eutimio et al., 2013).

Posteriormente se obtuvieron las proteínas totales y se separaron por electroforesis en un gel bidimensional (2-DGE). La comparación de los perfiles proteómicos (Figura 5) de ambas cepas demostró que los niveles de proteína OmpS1 no cambian en la mutante del sistema CRISPR-Cas, sin embargo, los niveles de la proteína OmpS2 disminuyen más del 99%. Así mismo OmpR desaparece en ausencia del sistema CRISPR-Cas debido a la ausencia de los genes *cas3*, *cse2*, *cas5*, *cas6e*, *cas1* y *cas2*, los cuales se demostró previamente están involucrados en el control positivo de este regulador transcripcional. En la Figura 5a, tanto OmpC y OmpF se observan como una sola mancha debido a que su peso molecular y punto isoeléctrico es muy parecido, sin embargo, en la Figura 5b observamos cómo en ausencia de OmpR también desaparece la proteína OmpC, la cual se sabe que depende de este regulador para expresarse (Villarreal et al., 2014). Por último, se observa que el nivel de OmpF disminuye, pero no desaparece, lo que correlaciona con los resultados obtenidos previamente (Medina-Aparicio et al., 2021).



Proteínas reguladas por CRISPR-Cas/LeuO+ en *Salmonella enterica* serovar Typhi identificadas por MALDI-TOF MS

Proteína	Gen	Abundancia (<i>S. Typhi</i> IMSS-1/ Δ CRISPR-cas) ^a	Referencias en bases de datos		pI	Peso Mol
			Organismo	Numero de acceso		
Porina	<i>ompS1</i>	255.5/62.7	<i>S. Typhi</i>	STY2203	4.4	51.7
Porina	<i>ompS2</i>	135.37/1.7	<i>S. Typhi</i>	STY1649	4.3	51
Porina	<i>ompC</i>	5475/15.89	<i>S. Typhi</i>	STY2493	4.63	41.25
Porina	<i>ompF</i>	5475/27	<i>S. Typhi</i>	STY1002	4.68	40.11
Regulador Transcripcional	<i>ompR</i>	21.2/0	<i>S. Typhi</i>	STY4294	6.9	27.3

^a Intensidad (OD) de *S. Typhi* IMSS-1/*S. Typhi* Δ CRISPR-cas

Figura 5. CRISPR-Cas está involucrado en la regulación de OmpS2 en *S. Typhi* IMSS-1. a) Proteínas totales de las cepas *S. Typhi* IMSS-1 silvestre y b) *S. Typhi* IMSS-1 Δ CRISPR-cas conteniendo el plásmido pFM*TrcleuO*-50, el cual fue inducido con 50 μ M de IPTG. Las cepas se cultivaron en medio MA a OD_{595nm} de 0.6. Las proteínas se visualizaron mediante una electroforesis bidimensional. Las flechas indican las principales proteínas de interés. Los resultados son de experimentos hechos por duplicado.

La transcripción de *ompS2* se abate en ausencia del sistema CRISPR-Cas

Los resultados obtenidos por electroforesis bidimensional fueron validados mediante un análisis del perfil transcripcional de la región reguladora de *ompS2*, los resultados obtenidos indican que la expresión de esta porina es nula en la cepa Δ CRISPR-cas y que la sobreexpresión del regulador LeuO por sí solo no es capaz de inducir la expresión de *ompS2* (Figura 6). Esto concuerda con los datos obtenidos previamente por el grupo de estudio con respecto a LeuO, el cual se sabe que desplaza a H-NS del promotor de *ompS2* y permite que OmpR se una a su región reguladora y promueva su expresión (Fernandez-Mora et al., 2004). Como resultado de la ausencia del sistema CRISPR-Cas, el regulador OmpR no está presente y por lo tanto no se activa la transcripción de *ompS2*.

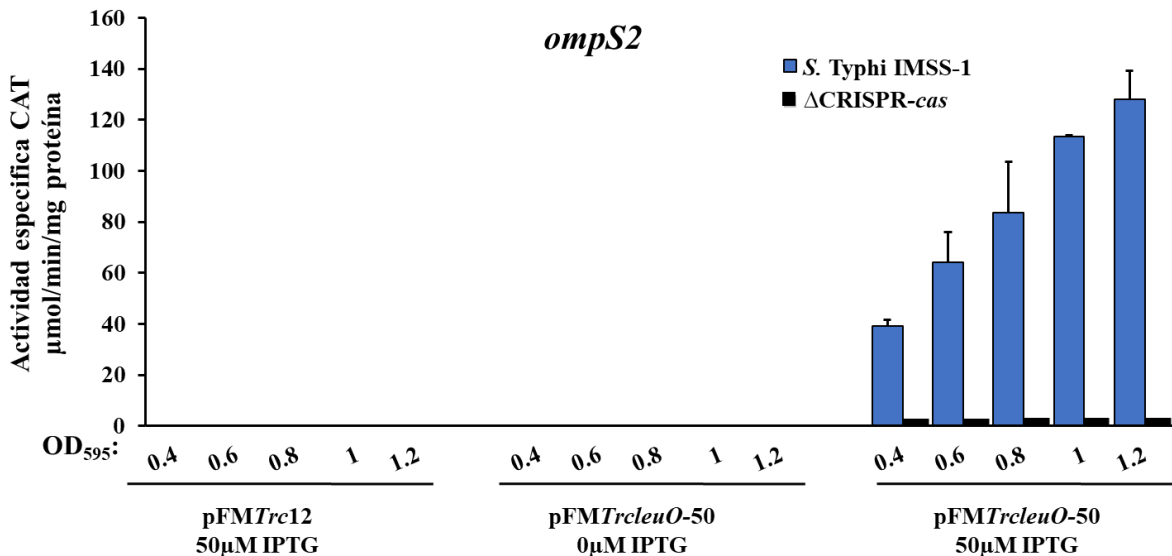


Figura 6. Perfil transcripcional de *ompS2* dependientes de LeuO. *S. Typhi* IMSS-1 y *S. Typhi* IMSS-1 Δ CRISPR-cas conteniendo los plásmidos pFMTrc12 y pFMTrcleuO-50 se transformaron de forma independiente con fusiones de la región reguladora de *ompS2* (b). La actividad específica de CAT de cada cepa se determinó utilizando muestras recolectadas a OD₅₉₅ de 0.4, 0.6, 0.8 y 1 y a las 12 h. Se utilizó 50µM de IPTG como inductor. Experimentos realizados por duplicado.

CRISPR-Cas regula OmpR para la síntesis de OmpS2 en *S. Typhi* IMSS-1

Como se mencionó anteriormente en *Salmonella Typhi* IMSS-1, el regulador OmpR es responsable de inducir a *ompS2* en presencia del regulador transcripcional LeuO, (Fernandez-Mora *et al.*, 2004; Hernández-Lucas *et al.*, 2008; De la Cruz *et al.*, 2007; De la Cruz & Calva, 2010). De tal manera que a través de un estudio de Western-Blot, se demostró que en ausencia de CRISPR-Cas el regulador maestro OmpR está ausente, aun en presencia de LeuO, lo que confirma que la expresión de *ompS2* no puede ser inducida por OmpR debido a la ausencia de CRISPR-Cas (Figura 7).

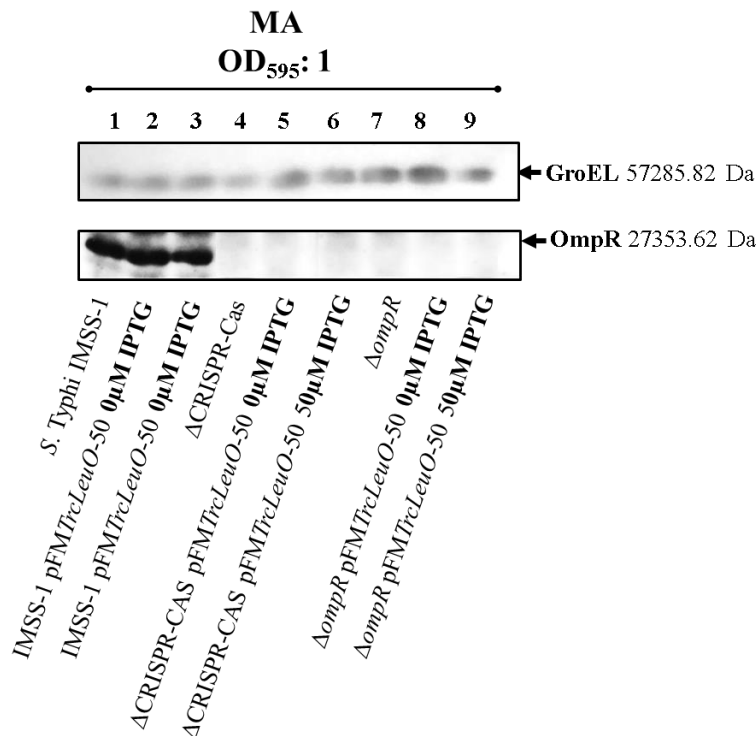


Figura 7. CRISPR-Cas regula positivamente a OmpR en *S. Typhi* IMSS-1. Western Blot de OmpR de las cepas *S. Typhi* IMSS-1 silvestre, *S. Typhi* IMSS-1 ΔCRISPR-cas y *S. Typhi* IMSS-1 ΔompR así como de las cepas que contienen los plásmidos pFMTrcleuO-50. Las cepas fueron crecidas en medio mínimo N a OD_{595nm} de 1. Las cepas con los plásmidos pFMTrcleuO-50 fueron inducidas con 50μM de IPTG.

cse2*, *cas5*, *cas6e*, *cas1*, *cas2* y *cas3* están involucrados en el control positivo de *ompS2

Para determinar el elemento genético específico del sistema CRISPR-Cas involucrado en la regulación de *ompS2*, se introdujeron fusiones transcripcionales de la región reguladora 5' de *ompS2* en las mutantes individuales de los genes *cas*, con el plásmido pFM*TrcleuO*-50 para la sobreexpresión de LeuO (Figura 8). Los resultados concuerdan con lo esperado ya que en ausencia de *cse2*, *cas5*, *cas6e*, *cas1*, *cas2* y *cas3* OmpR desaparece por lo que *ompS2* no se transcribe (Figura 4). Además, observamos que *cse1* y *cas7* no juegan un papel en la regulación de OmpS2.

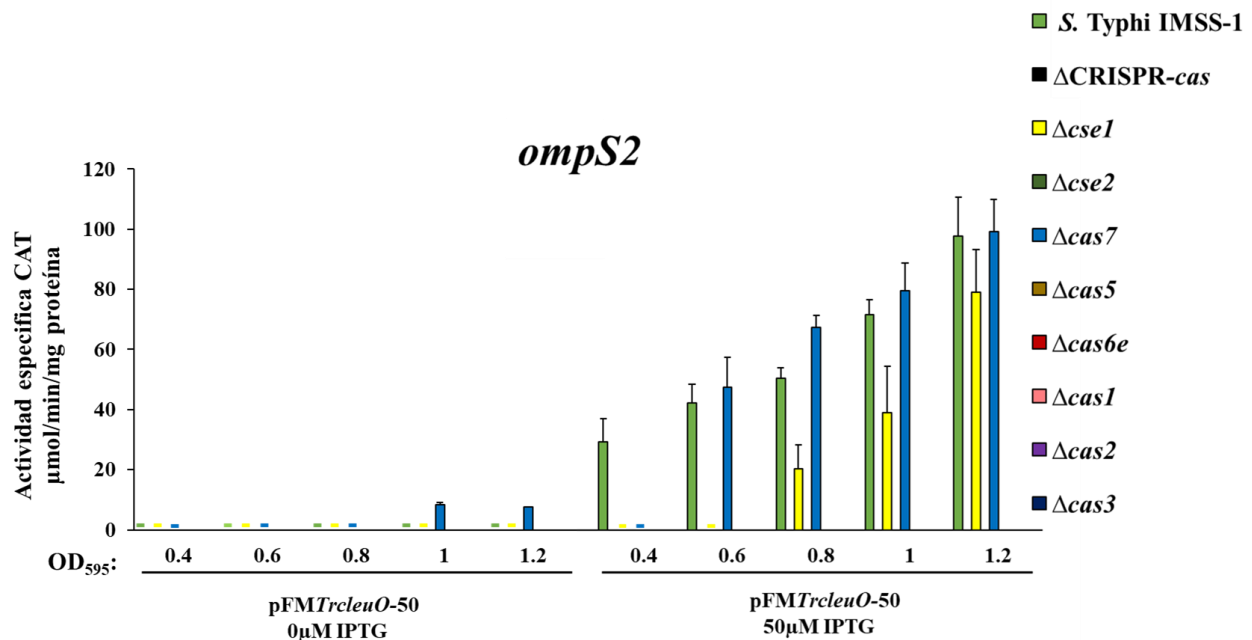


Figura 8. Perfil transcripcional del gen *ompS2* dependiente de LeuO en mutantes individuales de los genes *cas*. *S. Typhi* IMSS-1, *S. Typhi* IMSS-1 ΔCRISPR-cas, Δ*cse1*, Δ*cse2*, Δ*cas7*, Δ*cas5*, Δ*cas6e*, Δ*cas1*, Δ*cas2*, Δ*cas3* conteniendo el plásmido pFM*TrdeuO*-50 y con la fusión transcripcional de la región reguladora del gen *ompS2*. La actividad específica de CAT de cada cepa se determinó utilizando muestras recolectadas a OD: ₅₉₅ de 0.4, 0.6, 0.8 y 1 y a las 12 h. Se utilizó 50µM de IPTG como inductor. Experimentos realizados por duplicado.

Participación del sistema CRISPR-Cas en la regulación de proteínas de membrana externa en distintas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*

Debido a la participación del sistema CRISPR-Cas en la regulación de proteínas de membrana externa en *S. Typhi* IMSS-1, se verificó si este proceso ocurre en otras bacterias del género *Salmonella*. Para ello se obtuvieron mutantes en CRISPR-Cas en *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium SL1344 (*S. Typhimurium* SL1344) y se realizó un perfil de proteínas membrana externa, así mismo se realizó un Western-Blot de OmpR.

Los resultados demostraron que en *S. Typhimurium* SL1344 el sistema CRISPR-Cas no regula las proteínas de membrana externa, lo que es coherente con el hecho de que el regulador maestro OmpR encargado de la regulación positiva de OmpF y OmpC esté presente (Figura 9) (Walthers et al., 2004).

Asimismo, con el propósito de seguir estudiando la participación del sistema CRISPR-Cas en la regulación de proteínas de membrana externa, se hicieron mutantes en *Escherichia coli* K12 MC100 (*E. coli* K12 MC100) y *Citrobacter rodentium* DB5100 (*C. rodentium* DB510) del clúster CRISPR-Cas. Sin embargo, como se observa en la figura 9, este proceso mediante el cual CRISPR-Cas está involucrado en la regulación de proteínas de membrana externa en *S. Typhi* IMSS-1 no se conserva en los patógenos estudiados en este experimento.

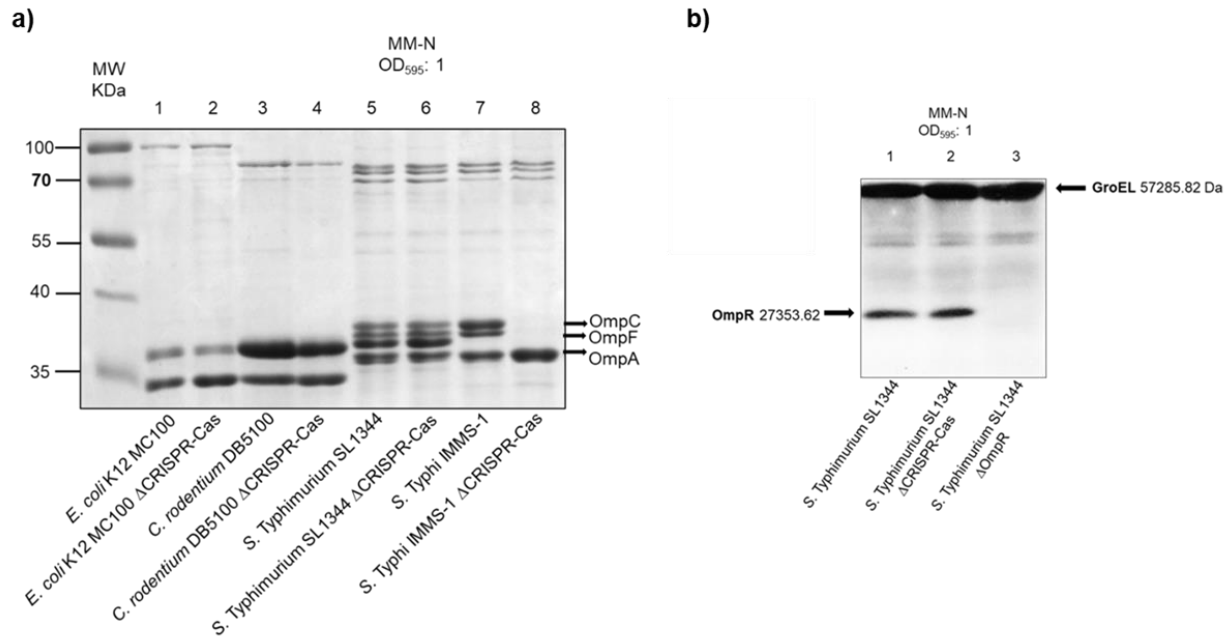


Figura 9. Proteínas de membrana externa en distintas bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. a) Perfil de proteínas de membrana de *E. coli* MC4100, *C. rodentium* DB5100, *S. Typhimurium* SL1344, *S. Typhi* IMSS-1 y sus respectivas mutantes del sistema CRISPR-Cas. Las flechas indican las tres OMPs más abundantes: OmpC, OmpF y OmpA. Se incluye el marcador de peso molecular (MW). Las proteínas fueron visualizadas utilizando azul de Coomassie. b) Western Blot de OmpR en las cepas *S. Typhimurium* SL1344 (carril 1), *S. Typhimurium* SL1344 ΔCRISPR-cas (carril 2) *S. Typhimurium* SL1344 ΔOmpR.

Discusión

El sistema CRISPR-Cas se encuentra distribuido ampliamente en el género *Salmonella* (Medina-Aparicio et al., 2018). Datos de nuestro laboratorio demuestran que *S. Typhi* IMSS-1 al ser transformada con una gran variedad de plásmidos, el sistema CRISPR-Cas no degrada estos elementos genéticos móviles. Adicionalmente en el caso de *S. Typhi* IMSS-1 el arreglo CRISPR, solo posee seis espaciadores, este número reducido de espaciadores sugiere que es un sistema inmunológico poco activo (Medina-Aparicio et al., 2017). Sin embargo, la alta conservación de este sistema genético en el género *Salmonella*, sugiere un papel biológico en este patógeno estricto de humanos (Medina-Aparicio et al., 2018). En este sentido diversos trabajos han demostrado que sistemas CRISPR-Cas están involucrados en la regulación de procesos asociados a la envoltura celular bacteriana (Cui et al., 2020; Faure et al., 2019; Newsom et al., 2021; Louwen et al., 2014).

La regulación de proteínas de membrana externa juega un papel muy importante en la vida libre y patogénica de *S. Typhi* (Benz, 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que en *S. Typhi* IMSS-1 las proteínas Cse2, Cas5, Cas6e, Cas1, Cas2 y Cas3 están involucradas en la regulación positiva del regulador de respuesta OmpR, que es un importante regulador implicado en la inducción de los genes que codifican para OmpF, OmpC y OmpS2 (Figura 4) (De la Cruz et al., 2007; De la Cruz & Calva, 2010; Fernández-Mora et al., 1995; Flores-Valdez et al., 2003, 2014; Hernández-Lucas et al., 2008; Moreno-Eutimio et al., 2013; Oropeza et al., 1999, Villarreal et al., 2014, Medina-Aparicio et al., 2021).

Además, se demostró que existe una compleja regulación en la remodelación de la membrana externa en *S. Typhi* IMSS-1 por el sistema CRISPR-Cas. Al respecto, se ha reportado que Cas6e, Cas1, Cse2 y Cas3 están involucradas en la regulación positiva de OmpF, mientras que Cas 5 y Cas 2 están involucradas en la regulación positiva de OmpC (Medina-Aparicio et al., 2021). Adicionalmente, nuestros resultados mostraron que Cas3, Cse2, Cas5, Cas6e, Cas 1 y Cas 2 en conjunto con la sobreexpresión de LeuO están involucradas en la regulación positiva de OmpS2 (Figura 8).

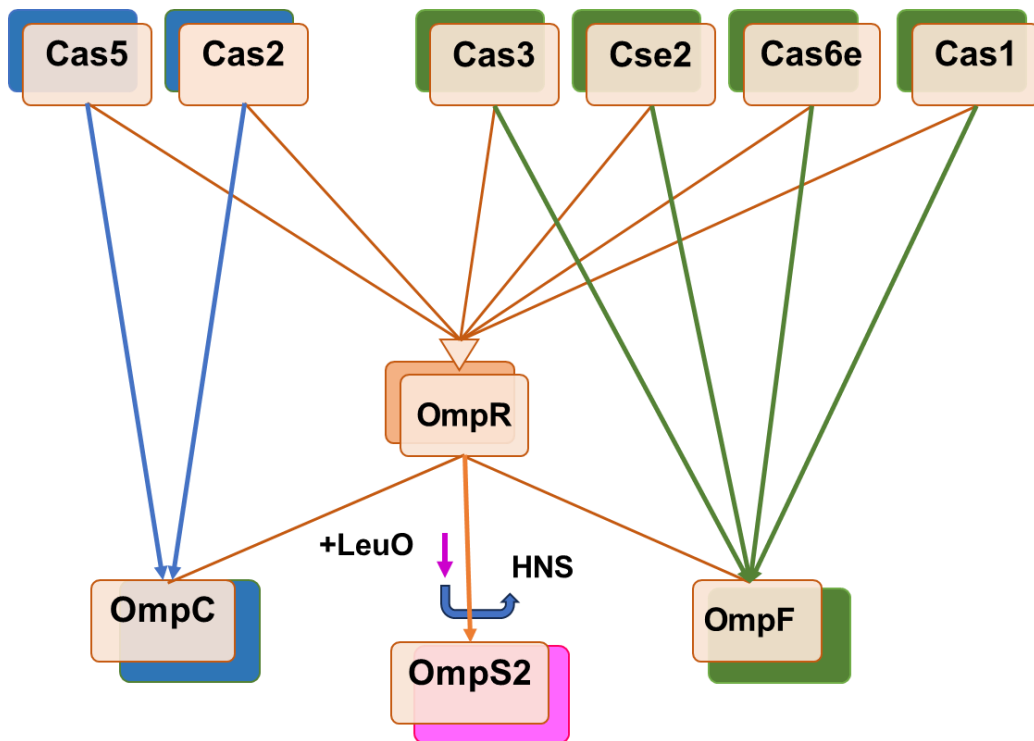


Figura 10. Modelo de regulación de las proteínas de membrana externa en *S. Typhi* IMSS-1.

El análisis del papel de CRISPR-Cas en la regulación de proteínas de membrana externa en otras enterobacterias, demostró que este sistema genético regula la síntesis de proteínas de membrana externa exclusivamente en *Salmonella Typhi* IMSS-1 a través de OmpR. En ese sentido es importante mencionar que aún en bacterias relacionadas filogenética y clínicamente con *S. Typhi*, tales como *S. Typhimurium* SL1344, *S. Typhi* Ty2 y *S. Typhi* CT18, CRISPR-Cas no regula proteínas de membrana externa, así como también, en *S. Paratyphi* B, CRISPR-Cas no se encuentra presente. Por lo anterior, el papel regulatorio descrito en este trabajo podría ser un fenómeno particular de *S. Typhi* IMSS-1.

En diferentes géneros bacterianos se ha observado que las proteínas Cas se encuentran involucradas en la regulación de factores de la transcripción que orquestan respuestas

celulares complejas (Ma et al., 2018; Gao et al., 2019; Sarkar & Sumby, 2017; Li et al., 2016). En el presente estudio se provee evidencia de que más de una proteína Cas se encuentra involucrada en la regulación del mantenimiento de la envoltura celular. Esto implica que las proteínas Cas probablemente se encuentran formando complejos proteicos para modular la expresión del regulador de respuesta OmpR en *S. Typhi* IMSS-1. Por lo tanto, la formación de complejos Cas no solamente ocurriría para degradar material genético foráneo, sino también para coordinar respuestas celulares a través de la regulación de factores de la transcripción.

Los datos generados en este trabajo fueron incluidos en el artículo denominado: **The CRISPR-Cas System Is Involved in OmpR Genetic Regulation for Outer Membrane Protein Synthesis in *Salmonella Typhi*** By Medina-Aparicio, L., Rodriguez-Gutierrez, S., Rebollar-Flores, J. E., Martinez-Batallar, A. G., Mendoza-Mejia, B. D., Aguirre-Partida, E. D., Vazquez, A., Encarnacion, S., Calva, E., Hernandez-Lucas, I. (2021). En este manuscrito yo participé como segundo autor.

Adicionalmente, en mi estancia en el laboratorio del Dr. Hernández Lucas participe también en el trabajo: **The *Salmonella enterica* serovar Typhi *ItrR* Gene Encodes Two Proteins Whose Transcriptional Expression is Up-Regulated by Alkaline pH and Repressed at Their Promoters and Coding Regions by H-NS and Lrp** By Rebollar-Flores, J. E., Medina-Aparicio, L., Osio Becerro, V. E., Villarreal, J. M., Mayo, S., Mendoza, B. D., Rodriguez-Gutierrez, S., Olvera, L., Davila, S., Encarnacion, S., Martinez-Batallar, G., Calva, E., Hernandez-Lucas, I. (2020).

Conclusiones

- El sistema CRISPR-Cas participa en la regulación de proteínas de membrana a través de la regulación de OmpR en *S. Typhi* IMSS-1.
- Las proteínas Cas3, Cse2, Cas5, Cas6e, Cas1 y Cas 2 participan en la regulación positiva de OmpR.
- Las proteínas Cas3, Cse2, Cas5, Cas6e, Cas1 y Cas 2 participan en la regulación positiva de OmpS2.
- La participación del sistema CRISPR-Cas en la regulación de proteínas de membrana no fue detectada en otras especies bacterianas como, *S. Typhimurium* SL1344, *Escherichia coli* K12 MC100 y *Citrobacter rodentium* DB5100.

Bibliografía

- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., Cox, D. B. T., Shmakov, S., Makarova, K. S., Semenova, E., & Minakhin, L. (2016). C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*.
- Adcox, H. E., Vasicek, E. M., Dwivedi V. (2016). *Salmonella* extracellular matrix components influence biofilm formation and gallbladder colonization. *Infect Immun*.
- Ahirwar, S. K., Pratap, C. B., Patel, S. K. (2014). Acid exposure induces multiplication of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Clin Microbiol*.
- Amitai, G., & Sorek, R. (2016). CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nature Reviews Microbiology*.
- Antillón, M., Warren, J. L., Crawford, F. W., Weinberger, D. M., Kürüm, E., Pak, G. D., Marks, F., & Pitzer, V. E. (2017). The burden of typhoid fever in low-and middle-income countries: a meta-regression approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*.
- Bachmann, N. L., Petty, N. K., Ben Zakour, N. L. (2014). Genome analysis and CRISPR typing of *Salmonella enterica* serovar Virchow. *BMC Genomics*.
- Balakrishnan, A., Schnare, M., Chakravorty, D. (2016). Of men not mice: bactericidal permeability increasing protein expressed in human macrophages acts as a phagocytic receptor and modulates entry and replication of Gram-negative bacteria. *Front Immunol*.
- Baldassarre, M., Solano-Collado, V., Balci, A., Colamarino, R. A., Dambuza, I. M., Reid, D. M., Wilson, H. M., Brown, G. D., Mukhopadhyay, S., Dougan, G., Spanò, S. (2021). The Rab32/BLOC-3–dependent pathway mediates host defense against different pathogens in human macrophages. *Science Advances*.
- Benz, R. (2006). Bacterial and eukaryotic porins: structure, function, mechanism. John Wiley & Sons.
- Berrocal, L., Fuentes, J. A., Trombert A. N. (2015). *stg* fimbrial operon from *S. Typhi* STH2370 contributes to association and cell disruption of epithelial and macrophage–like cells. *Biol Res*.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*.
- Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Van Der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*.
- Byrne, A., Johnson, R., Ravenhall, M. (2018). Comparison of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Typhimurium reveals typhoidal serovar-specific responses to bile. *Infect Immun*.
- Cady, K. C., & O’Toole, G. A. (2011). Non-identity-mediated CRISPR-bacteriophage interaction mediated via the Csy and Cas3 proteins. *Journal of Bacteriology*.
- Cárdenas, S. Q. (2016). Infecciones por bacterias del género *Salmonella*: Relevancia en la práctica clínica. *Revista Clínica Escuela de Medicina, UCR-HSJD*.
- Chowdhury R, Das S, Ta A, Das S. (2019). Epithelial invasion by *Salmonella* Typhi using STIV-Met interaction. *Cell Microbiol*.
- Contreras-Soto, M. B., Medrano-Félix, J. A., Ibarra-Rodríguez, J. R., Martínez-Urtaza, J., Chaidez, Q. C., & Castro-del Campo, N. (2019). The last 50 years of *Salmonella* in Mexico: Sources of isolation and factors that influence its prevalence and diversity. *Revista Bio Ciencias*.

- Cook, G. C., & Zumla, A. (2008). Manson's tropical diseases. Elsevier Health Sciences.
- Crawford, R. W., Rosales, R. R., Ramírez, A. M. (2010). Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage. Proc Natl Acad Sci USA.
- Cui, L., Wang, X., Huang, D., Zhao, Y., Feng, J., Lu, Q., Pu, Q., Wang, Y., Cheng, G., & Wu, M. (2020). CRISPR-cas3 of *Salmonella* upregulates bacterial biofilm formation and virulence to host cells by targeting quorum-sensing systems. Pathogens.
- Dahora, L. C., Jin C., Spreng R. L. (2019). IgA and IgG1 specific to Vi polysaccharide of *Salmonella* Typhi correlate with protection status in a typhoid fever controlled human infection model. Front Immunol.
- 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.
- De la Cruz, M. Á., & Calva, E. (2010). The complexities of porin genetic regulation. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.
- De la Cruz, M. Á., Fernández- Mora, M., Guadarrama, C., Flores- Valdez, M. A., Bustamante, V. H., Vázquez, A., & Calva, E. (2007). LeuO antagonizes H- NS and StpA- dependent repression in *Salmonella enterica* ompS1. Molecular Microbiology.
- Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S., & Hensel, M. (1999). Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. Molecular Microbiology.
- Doudna, J. A. and Charpentier, E. (2014). 'The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9', Science.
- Dougan, G., Baker, S. (2014). *Salmonella enterica* serovar Typhi and the pathogenesis of typhoid fever. Annu Rev Microbiol.
- Dugar, G., Leenay, R. T., Eisenbart, S. K., Bischler, T., Aul, B. U., Beisel, C. L., & Sharma, C. M. (2018). CRISPR RNA-dependent binding and cleavage of endogenous RNAs by the *Campylobacter jejuni* Cas9. Molecular Cell.
- Encarnación, S., M. Hernández, S. Contreras, G. Martínez-Batallar, M. C. Vargas, and J. Mora. (2005). Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes. Biol. Proced.
- Fagan, R., Fairweather, N. (2014). Biogenesis and functions of bacterial S-layers. Nat Rev Microbiol.
- Faure, G., Makarova, K. S., & Koonin, E. V. (2019). CRISPR–Cas: complex functional networks and multiple roles beyond adaptive immunity. Journal of Molecular Biology.
- Fernández-Mora, M., Oropeza, R., Puente, J., & Calva, E. (1995). Isolation and characterization of *ompS1*, a novel *Salmonella* typhi outer membrane protein-encoding gene. Gene.
- Fernández-Mora, M., J. L. Puente, and E. Calva. (2004). OmpR and LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* serovar Typhi *ompS2* porin gene. J. Bacteriol.
- Flores-Valdez, M. A., Fernandez-Mora, M., Ares, M. A., Giron, J. A., Calva, E., & De la Cruz, M. A. (2014). OmpR phosphorylation regulates *ompS1* expression by differentially controlling the use of promoters. Microbiology.
- Flores-Valdez, M. A., Puente, J. L., & Calva, E. (2003). Negative osmoregulation of the *Salmonella ompS1* porin gene independently of OmpR in an *hns* background. Journal of Bacteriology.
- Gao, N. J., Al-Bassam, M. M., Poudel, S., Wozniak, J. M., Gonzalez, D. J., Olson, J., Zengler, K., Nizet, V., & Valderrama, J. A. (2019). Functional and proteomic analysis of *Streptococcus pyogenes* virulence upon loss of its native Cas9 nuclease. Frontiers in Microbiology.
- Gunderson, F. F., Mallama, C. A., Fairbairn, S. G., & Cianciotto, N. P. (2015). Nuclease activity of *Legionella*

- pneumophila* Cas2 promotes intracellular infection of amoebal host cells. *Infection and Immunity*.
- Hale, C. R., Majumdar, S., Elmore, J., Pfister, N., Compton, M., Olson, S., Resch, A. M., Glover III, C. V. C., Graveley, B. R., & Terns, R. M. (2012). Essential features and rational design of CRISPR RNAs that function with the Cas RAMP module complex to cleave RNAs. *Molecular Cell*.
- Hale, C. R., Zhao, P., Olson, S., Duff, M. O., Graveley, B. R., Wells, L., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2009). RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*.
- Hernández-Lucas, I., Gallego-Hernández, A. L., Encarnación, S., Fernández-Mora, M., Martínez-Batallar, A. G., Salgado, H., Oropeza, R., & Calva, E. (2008). The LysR-type transcriptional regulator LeuO controls expression of several genes in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Journal of Bacteriology*.
- Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S., Charpentier, E. (2018). The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*.
- Hochstrasser, M. L., & Doudna, J. A. (2015). Cutting it close: CRISPR-associated endoribonuclease structure and function. *Trends in Biochemical Sciences*.
- Hurkman, W. J., & C. K. Tanaka. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol*.
- 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*.
- 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*.
- Ivančić-Baće, I., Cass, S. D., Wearne, S. J., & Bolt, E. L. (2015). Different genome stability proteins underpin primed and naive adaptation in *E. coli* CRISPR-Cas immunity. *Nucleic Acids Research*.
- Jackson, S. A., McKenzie, R. E., Fagerlund, R. D., Kieper, S. N., Fineran, P. C., & Brouns, S. J. J. (2017). CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science*.
- John, S. G., Marshall, J. M., Baker, S. (2014). *Salmonella* chronic carriage: epidemiology, diagnosis and gallbladder persistence. *Trends Microbiol*.
- Jore, M. M., Lundgren, M., Van Duijn, E., Bultema, J. B., Westra, E. R., Waghmare, S. P., Wiedenheft, B., Pul, Ü., Wurm, R., & Wagner, R. (2011). Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nature Structural & Molecular Biology*.
- Jorth, P., & Whiteley, M. (2012). An evolutionary link between natural transformation and CRISPR adaptive immunity. *MBio*.
- Kawaji, H., Mizuno, T., & Mizushima, S. (1979). Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins O-8 and O-9 of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*.
- Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, M., Dougan, G., & Achtman, M. (2002). *Salmonella* Typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infection, Genetics and Evolution*, 2(1), 39–45.
- Killelea, T., & Bolt, E. L. (2017). CRISPR-Cas adaptive immunity and the three Rs. Portland Press Ltd.
- Koonin, E. V., & Makarova, K. S. (2019). Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Zhang, F. (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology*.
- Kushwaha, S. K., Bhavesh, N. L. S., Abdella, B., Lahiri, C., & Marathe, S. A. (2020). The phylogenomics of

CRISPR-Cas system and revelation of its features in *Salmonella*. Scientific Reports.

- Leclerc, J., Dozois, C. M., Daigle, F. (2013). Role of the *Salmonella enterica* serovar Typhi Fur regulator and small RNAs RfrA and RfrB in iron homeostasis and interaction with host cells. Microbiology.
- Li, R., Fang, L., Tan, S., Yu, M., Li, X., He, S., Wei, Y., Li, G., Jiang, J., & Wu, M. (2016). Type I CRISPR-Cas targets endogenous genes and regulates virulence to evade mammalian host immunity. Cell Research.
- Lin, P.; Pu, Q.; Shen, G.; Li, R.; Guo, K.; Zhou, C.; Liang, H.; Jiang, J.; Wu, M. (2019). CdpR Inhibits CRISPR-Cas Adaptive Immunity to Lower Anti-viral Defense while Avoiding Self-Reactivity. iScience.
- Liu, T., Liu, Z., Ye, Q., Pan, S., Wang, X., Li, Y., Peng, W., Liang, Y., She, Q., & Peng, N. (2017). Coupling transcriptional activation of CRISPR–Cas system and DNA repair genes by Csa3a in *Sulfolobus islandicus*. Nucleic Acids Research.
- 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.
- Louwen, R., Horst-Kreft, D., De Boer, A. G., Van Der Graaf, L., de Knecht, G., Hamersma, M., Heikema, A. P., Timms, A. R., Jacobs, B. C., & Wagenaar, J. A. (2013). A novel link between *Campylobacter jejuni* bacteriophage defence, virulence and Guillain–Barré syndrome. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.
- Louwen, R., Staals, R. H. J., Endtz, H. P., van Baarlen, P., & van der Oost, J. (2014). The Role of CRISPR-Cas Systems in Virulence of Pathogenic Bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews.
- Lovane, L., Martínez, M. J., Massora, S. (2016). Carriage prevalence of *Salmonella enterica* serotype Typhi in gallbladders of adult autopsy cases from Mozambique. Journal of Infection in Developing Countries.
- Ma, K., Cao, Q., Luo, S., Wang, Z., Liu, G., Lu, C., & Liu, Y. (2018). *cas9* enhances bacterial virulence by repressing the *regR* transcriptional regulator in *Streptococcus agalactiae*. Infection and Immunity.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., & Haft, D. H. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. Nature Reviews Microbiology.
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., & Horvath, P. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. Nature Reviews Microbiology.
- Mandell, G. L., Bennett, J. E., & Dolin, R. (2015). Principles and practice of Infectious Diseases (8th Edition).
- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2010). Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. Nature.
- Medina-Aparicio, L., Dávila, S., Rebollar-Flores, J. E., Calva, E., Hernández-Lucas, I. The CRISPR-Cas system in *Enterobacteriaceae*. Pathog Dis.
- Medina-Aparicio, L., Rebollar-Flores, J. E., Beltrán-Luviano, A. A., Vázquez, A., Gutiérrez-Ríos, R. M., Olvera, L., Calva, E., & Hernández-Lucas, I. (2017). CRISPR-Cas system presents multiple transcriptional units including antisense RNAs that are expressed in minimal medium and upregulated by pH in *Salmonella enterica* serovar Typhi. Microbiology.
- Medina-Aparicio, L., Rebollar-Flores, J. E., Gallego-Hernández, A. L., Vázquez, A., Olvera, L., Gutiérrez-Ríos, R. M., Calva, E., & Hernandez-Lucas, I. (2011). The CRISPR/Cas immune system is an operon regulated by LeuO, H-NS, and leucine-responsive regulatory protein in *Salmonella enterica* serovar Typhi. Journal of Bacteriology.
- Medina-Aparicio, L., Rodriguez-Gutierrez, S., Rebollar-Flores, J. E., Martínez-Batallar, Á. G., Mendoza-Mejía, B. D., Aguirre-Partida, E. D., Vázquez, A., Encarnación, S., Calva, E., & Hernández-Lucas, I. (2021). The CRISPR-Cas System Is Involved in OmpR Genetic Regulation for Outer

Membrane Protein Synthesis in *Salmonella* Typhi. *Frontiers in Microbiology*.

Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*.

Moreno- Eutimio, M. A., Tenorio- Calvo, A., Pastelin- Palacios, R., Perez- Shibayama, C., Gil- Cruz, C., López- Santiago, R., Baeza, I., Fernández- Mora, M., Bonifaz, L., & Isibasi, A. (2013). *Salmonella* Typhi OmpS1 and OmpS2 porins are potent protective immunogens with adjuvant properties. *Immunology*.

Newsom, S., Parameshwaran, H. P., Martin, L., & Rajan, R. (2021). The CRISPR-Cas Mechanism for Adaptive Immunity and Alternate Bacterial Functions Fuels Diverse Biotechnologies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.

Nickerson, K. P., Senger S., Zhang Y. (2018). *Salmonella* Typhi colonization provokes extensive transcriptional changes aimed at evading host mucosal immune defense during early infection of human intestinal tissue. *EBioMedicine*.

Nuccio, S-p, Rüssmann, H., Bäumlner, A. J. (2010). The TviA auxiliary protein renders the *Salmonella* enterica serotype Typhi RcsB regulon responsive to changes in osmolarity. *Mol Microbiol*.

Nishimasu, H., Nureki, O., (2017). Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector nucleases. *Current Opinion in Structural Biology*.

O'Connell, M. R., Oakes, B. L., Sternberg, S. H., East-Seletsky, A., Kaplan, M., & Doudna, J. A. (2014). Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*.

Oropeza, R., Sampieri, C. L., Puente, J. L., & Calva, E. (1999). Negative and positive regulation of the non- osmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella* Typhi: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Molecular Microbiology*.

Perez-Rodriguez, R., Haitjema, C., Huang, Q., Nam, K. H., Bernardis, S., Ke, A. (2011). Envelope stress is a trigger of CRISPR RNA-mediated DNA silencing in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*.

Plagens, A., Richter, H., Charpentier, E., & Randau, L. (2015). DNA and RNA interference mechanisms by CRISPR-Cas surveillance complexes. *FEMS Microbiology Reviews*.

Puente, J. L., Flores, V., Fernández, M., Fuchs, Y., & Calva, E. (1987). Isolation of an ompC-like outer membrane protein gene from *Salmonella* Typhi. *Gene*.

Ratner, H. K., Escalera-Maurer, A., Le Rhun, A., Jaggavarapu, S., Wozniak, J. E., Crispell, E. K., Charpentier, E., & Weiss, D. S. (2019). Catalytically active Cas9 mediates transcriptional interference to facilitate bacterial virulence. *Molecular Cell*.

Rauch, B. J., Silvis, M. R., Hultquist, J. F., Waters, C. S., McGregor, M. J., Krogan, N. J., & Bondy-Denomy, J. (2017). Inhibition of CRISPR-Cas9 with bacteriophage proteins. *Cell*.

Richter, C., Chang, J. T., & Fineran, P. C. (2012). Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated (Cas) systems. *Viruses*.

Rousseau, B. A., Hou, Z., Gramelspacher, M. J., Zhang, Y. (2018). Programmable RNA cleavage and recognition by a natural CRISPR-Cas9 system from *Neisseria meningitidis*. *Molecular Cell*.

Rodriguez-Morales, O., M. Fernandez-Mora, I. Hernandez-Lucas, A. Vazquez, J. L. Puente, & E. Calva. 2006. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *ompS1* and *ompS2* mutants are attenuated for virulence in mice. *Infect. Immun*.

Ryan, M. P., O'Dwyer, J., & Adley, C. C. (2017). Evaluation of the complex nomenclature of the clinically and veterinary significant pathogen *Salmonella*. *BioMed Research International*.

Samai, P., Pyenson, N., Jiang, W., Goldberg, G. W., Hatoum-Aslan, A., & Marraffini, L. A. (2015). Co-

- transcriptional DNA and RNA cleavage during type III CRISPR-Cas immunity. *Cell*.
- Salerno, G. R., Galen, J. E., Levine M. M. (2018). Manipulation of *Salmonella* Typhi Gene expression impacts innate cell responses in the human intestinal mucosa. *Front Immunol*.
- Sampson, T. R., & Weiss, D. S. (2013). Alternative roles for CRISPR/Cas systems in bacterial pathogenesis. *PLoS Pathogens*.
- Sarkar, P., & Sumbly, P. (2017). Regulatory gene mutation: a driving force behind group a *Streptococcus* strain- and serotype- specific variation. *Molecular Microbiology*.
- Serbanescu, M. A., Cordova, M., Krastel, K., Flick, R., Beloglazova, N., Latos, A., Yakunin, A. F., Senadheera, D. B. & Cvitkovitch, D. G. (2015). Role of the *Streptococcus mutans* CRISPR/Cas systems in immunity and cell physiology. *J Bacteriol*.
- Shabbir, M. A. B., Tang, Y., Xu, Z., Lin, M., Cheng, G., Dai, M. (2018). The Involvement of the *cas9* Gene in Virulence of *Campylobacter jejuni*. *Front. Cell Infect. Microbiol*.
- Shariat, N., Timme, R. E., Pettengill, J. B., Barrangou, R., & Dudley, E. G. (2015). Characterization and evolution of *Salmonella* CRISPR-Cas systems. *Microbiology*.
- Simuyandi, M., Kapulu M. (2016). Anti-microbial peptide gene expression during oral vaccination: analysis of a randomized controlled trial. *Clin Exp Immunol*.
- Singh, K., Milstein, J. N., & Navarre, W. W. (2016). Xenogeneic silencing and its impact on bacterial genomes. *Annual Review of Microbiology*.
- Spano, S., Galan, J. E. (2012). A Rab32-dependent pathway contributes to *Salmonella* Typhi host restriction. *Science*.
- Stern, A., Keren, L., Wurtzel, O., Amitai, G., & Sorek, R. (2010). Self-targeting by CRISPR: gene regulation or autoimmunity? *Trends in Genetics*.
- Strutt, S. C., Torrez, R. M., Kaya, E., Negrete, O. A., & Doudna, J. A. (2018). RNA-dependent RNA targeting by CRISPR-Cas9. *Elife*.
- Velásquez, J. C., Hidalgo, A. A., Villagra N. (2016). SPI-9 of *Salmonella enterica* serovar Typhi is constituted by an operon positively regulated by RpoS and contributes to adherence to epithelial cells in culture. *Microbiology*.
- Villarreal, J. M., Becerra- Lobato, N., Rebollar- Flores, J. E., Medina- Aparicio, L., Carbajal- Gómez, E., Zavala- García, M. L., Vázquez, A., Gutiérrez- Ríos, R. M., Olvera, L., & Encarnación, S. (2014). The *Salmonella enterica* serovar Typhi *ltrR- ompR- ompC- ompF* genes are involved in resistance to the bile salt sodium deoxycholate and in bacterial transformation. *Molecular Microbiology*.
- Wang, M., Qi, L., Xiao, Y. (2015) *SufC* may promote the survival of *Salmonella enterica* serovar Typhi in macrophages. *Microb Pathog*.
- Waddington, C. S., Darton, T. C., Jones, C., Haworth, K., Peters, A., John, T., Thompson, B. A. V, Kerridge, S. A., Kingsley, R. A., & Zhou, L. (2014). An outpatient, ambulant-design, controlled human infection model using escalating doses of *Salmonella* Typhi challenge delivered in sodium bicarbonate solution. *Clinical Infectious Diseases*.
- Wallace, R. A., Black, W. P., Yang, X., & Yang, Z. (2014). A CRISPR with roles in *Myxococcus xanthus* development and exopolysaccharide production. *Journal of Bacteriology*.
- Walters, D., Go, A., & Kenney, L. J. (2004). Regulation of Porin Gene Expression by the Two- Component Regulatory System EnvZ/OmpR. *Bacterial and Eukaryotic Porins: Structure, Function, Mechanism*.
- Wang, J., Li, J., Zhao, H., Sheng, G., Wang, M., Yin, M., & Wang, Y. (2015). Structural and mechanistic basis of PAM-dependent spacer acquisition in CRISPR-Cas systems. *Cell*.

- Washburn, M. P., Wolters, D., & Yates, J. R. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology*.
- Watters, K. E., Fellmann, C., Bai, H. B., Ren, S. M., & Doudna, J. A. (2018). Systematic discovery of natural CRISPR-Cas12a inhibitors. *Science*.
- Wilson R. P., Raffatellu M., Chessa D., Winter S. E., Tükelc., Bäumlner A. J. (2008). The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. *Cellular microbiology*.
- Wimmer, F., & Beisel, C. L. (2020). CRISPR-Cas systems and the paradox of self-targeting spacers. *Frontiers in Microbiology*.
- Winter, S. E., Winter, M. G., Poon, V. (2014). *Salmonella enterica* serovar Typhi conceals the invasion-associated type three secretion system from the innate immune system by gene regulation. *PLoS Pathog.*
- Xie, X., Hu, Y., Xu, Y. (2017). Genetic analysis of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum based on characterization and evolution of CRISPR sequence. *Vet Microbiol.*
- Yue, M., Han, X., De Masi L. (2017). Allelic variation contributes to bacterial host specificity. *Nat Commun.*
- Zegans, M. E., Wagner, J. C., Cady, K. C., Murphy, D. M., Hammond, J. H., & O'Toole, G. A. (2009). Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*.
- Zhang, F., Zhao, S., Ren, C., Zhu, Y., Zhou, H., Lai, Y., Zhou, F., Jia, Y., Zheng, K., & Huang, Z. (2018). CRISPRminer is a knowledge base for exploring CRISPR-Cas systems in microbe and phage interactions. *Communications Biology*.

Anexo 1

Tabla 4. Genes que se expresan diferencialmente en ausencia de CRISPR-Cas en <i>S. Typhi</i> IMSS-1						
Genes que aumenta su expresión				Genes que disminuyen su expresión		
	Número de oligo	ID gen	Zscore	Número de oligo	ID gen	Zscore
1	ST_10005249	STM4288	4.663538	ST_10004838	STM3765	-5.876758
2	ST_10005396	STM4472	4.451684	ST_10003698	STM2353	-5.32441
3	ST_10000821	STM3390	4.309681	ST_10003052	STM1605	-4.536761
4	ST_10005213	STM4249	4.264167	ST_10004458	STM3317	-4.354445
5	ST_10005395	STM4471	4.078546	ST_10003240	STM1818	-3.877293
6	ST_10005285	STM4331	4.068816	ST_10003428	STM2045	-3.867885
7	ST_10005209	STM4245	4.024296	ST_10000550	STM1538	-3.853241
8	ST_10005205	STM4241	4.02294	ST_10003041	STM1593	-3.779402
9	ST_10004784	STM3701	3.850193	ST_10000593	STM1868A	-3.622795
10	ST_10003325	STM1916	3.81579	ST_10003854	STM2534	-3.58811
11	ST_10002096	STM0413	3.808444	ST_10000096	HCM2.0047	-3.46398
12	ST_10004343	STM3187	3.745599	ST_10000337	STM0274A	-3.428541
13	ST_10005237	STM4274	3.735287	ST_10003148	STM1715	-3.419809
14	ST_10003385	STM1986	3.662126	ST_10000192	PSLT013	-3.401512
15	ST_10005257	STM4296	3.607398	ST_10003215	STM1791	-3.253991
16	ST_10004461	STM3320	3.606527	ST_10005141	STM4131	-3.24591
17	ST_10001243	STY2061	3.592918	ST_10001108	STY1068	-3.134414
18	ST_10001315	STY3067	3.3798	ST_10004757	STM3672	-3.105688
19	ST_10005545	STY3579	3.366481	ST_10000072	HCM2.0023c	-3.096623
20	ST_10005546	STY3664	3.35202	ST_10002942	STM1463	-3.078492
21	ST_10005204	STM4240	3.326738	ST_10000249	PSLT076	-3.07181

22	ST_10005253	STM4292	3.294626	ST_10000671	STM2592	-3.061933
23	ST_10005261	STM4300	3.293339	ST_10000129	HCM2.0080	-2.973239
24	ST_10000391	STM0574	3.247051	ST_10003243	STM1821	-2.968745
25	ST_10005206	STM4242	3.177893	ST_10003788	STM2457	-2.912469
26	ST_10005417	STM4512	3.144456	ST_10003660	STM2314	-2.895191
27	ST_10000690	STM2611.S	3.144436	ST_10003444	STM2063	-2.849657
28	ST_10005277	STM4323	3.113731	ST_10000999	STM4533	-2.839477
29	ST_10005227	STM4264	3.090295	ST_10000197	PSLT018	-2.835521
30	ST_10005233	STM4270	3.08738	ST_10002328	STM0693	-2.750404
31	ST_10004842	STM3769.S	3.086153	ST_10003337	STM1928	-2.713393
32	ST_10005466	STM4583	3.083593	ST_10002130	STM0450	-2.712475
33	ST_10005218	STM4254	3.064221	ST_10001083	STY1040	-2.677518
34	ST_10001323	STY3089	3.035746	ST_10003136	STM1703	-2.631146
35	ST_10005238	STM4275	2.985525	ST_10001333	STY3192	-2.617358
36	ST_10005547	STY3668	2.960935	ST_10003323	STM1914	-2.579461
37	ST_10002372	STM0744	2.943783	ST_10000103	HCM2.0054c	-2.546357
38	ST_10005212	STM4248	2.884609	ST_10003147	STM1714	-2.518084
39	ST_10005239	STM4276	2.864159	ST_10000193	PSLT014	-2.513395
40	ST_10002282	STM0630	2.845889	ST_10000761	STM2903	-2.513377
41	ST_10004148	STM2956	2.82775	ST_10002981	STM1509	-2.512233
42	ST_10001298	STY2749	2.807411	ST_10003027	STM1579	-2.468774
43	ST_10002873	STM1389	2.789347	ST_10000085	HCM2.0036c	-2.436476
44	ST_10005009	STM3969	2.778258	ST_10003187	STM1761	-2.427849
45	ST_10003962	STM2688	2.769196	ST_10003149	STM1716	-2.409798
46	ST_10000035	HCM1.231c	2.766447	ST_10000127	HCM2.0078	-2.390204
47	ST_10002959	STM1485	2.763163	ST_10000981	STM4486	-2.345349
48	ST_10003153	STM1720	2.76157	ST_10000408	STM0672	-2.341247
49	ST_10004629	STM3509	2.756191	ST_10002544	STM0991	-2.319092

50	ST_10005248	STM4287.S	2.737523	ST_10003547	STM2176	-2.31595
51	ST_10001577	HCM1.234c	2.733254	ST_10000006	HCM1.144	-2.313787
52	ST_10001255	STY2073	2.728266	ST_10003242	STM1820	-2.311094
53	ST_10005208	STM4244	2.717018	ST_10001777	STM0027	-2.306046
54	ST_10003694	STM2349	2.716523	ST_10002783	STM1275	-2.304138
55	ST_10000054	HCM2.0005c	2.713284	ST_10000373	STM0437	-2.292432
56	ST_10005392	STM4468	2.709862	ST_10004121	STM2921	-2.260218
57	ST_10005214	STM4250	2.708657	ST_10003048	STM1601	-2.255454
58	ST_10004731	STM3643	2.706607	ST_10004140	STM2948	-2.222238
59	ST_10005279	STM4325	2.700925	ST_10003207	STM1781	-2.205674
60	ST_10005163	STM4169	2.693016	ST_10002447	STM0842	-2.19129
61	ST_10003390	STM1992	2.688266	ST_10000562	STM1570	-2.173576
62	ST_10004117	STM2915	2.685494	ST_10002199	STM0525	-2.170654
63	ST_10005305	STM4356	2.671366	ST_10002404	STM0788	-2.170423
64	ST_10001279	STY2356	2.618109	ST_10003112	STM1677	-2.155134
65	ST_10004914	STM3857	2.591013	ST_10003655	STM2309	-2.154486
66	ST_10000471	STM0925.S	2.590527	ST_10000151	HCM2.0102c	-2.147551
67	ST_10003144	STM1711	2.563567	ST_10000380	STM0538	-2.140319
68	ST_10004453	STM3312	2.558795	ST_10003116	STM1681	-2.133602
69	ST_10005199	STM4235	2.557921	ST_10004099	STM2891	-2.123963
70	ST_10004851	STM3781	2.540923	ST_10002295	STM0644	-2.120252
71	ST_10004945	STM3898	2.519234	ST_10001509	STY4662	-2.118264
72	ST_10003419	STM2036	2.518505	ST_10002912	STM1431	-2.116406
73	ST_10003380	STM1979	2.502802	ST_10003211	STM1787	-2.107794
74	ST_10001436	STY4549	2.487629	ST_10000113	HCM2.0064c	-2.095585
75	ST_10003303	STM1892.S	2.48472	ST_10002091	STM0408	-2.088307
76	ST_10005297	STM4344	2.479216	ST_10000203	PSLT026	-2.086891
77	ST_10004609	STM3489	2.469744	ST_10001985	STM0262	-2.082312

78	ST_10000765	STM2917	2.4512	ST_10000361	STM0342	-2.076722
79	ST_10003483	STM2107	2.446758	ST_10002741	STM1227	-2.066246
80	ST_10005398	STM4474	2.445115	ST_10002138	STM0458	-2.06072
81	ST_10005011	STM3971	2.438001	ST_10003476	STM2099	-2.056764
82	ST_10002500	STM0938	2.425921	ST_10000168	HCM2.0121c	-2.052425
83	ST_10005094	STM4073	2.412748	ST_10000101	HCM2.0052c	-2.048483
84	ST_10000118	HCM2.0069c	2.409311	ST_10005561	STM3755	-2.04715
85	ST_10005289	STM4336	2.400914	ST_10000908	STM4114	-2.046739
86	ST_10002097	STM0414	2.400227	ST_10001271	STY2298	-2.043558
87	ST_10003094	STM1658	2.397146	ST_10005569	STY4420	-2.037424
88	ST_10003322	STM1913	2.395661	ST_10000605	STM1995	-2.031502
89	ST_10001120	STY1366	2.389466	ST_10000669	STM2590	-2.025421
90	ST_10005223	STM4260	2.380254	ST_10002913	STM1432	-2.021969
91	ST_10005185	STM4221	2.372811	ST_10003968	STM2699	-2.019419
92	ST_10003376	STM1975	2.371464	ST_10002652	STM1132	-2.01216
93	ST_10005035	STM4001	2.346608	ST_10004354	STM3198	-2.007069
94	ST_10003311	STM1901	2.324511	ST_10001389	STY3919	-2.000466
95	ST_10005090	STM4066	2.321336			
96	ST_10001306	STY2905	2.306347			
97	ST_10005281	STM4327	2.300794			
98	ST_10000191	PSLT011	2.290294			
99	ST_10004732	STM3644	2.287834			
100	ST_10005111	STM4090	2.28093			
101	ST_10005245	STM4284	2.275435			
102	ST_10003216	STM1792	2.261367			
103	ST_10005397	STM4473	2.258919			
104	ST_10001390	STY3922	2.246217			
105	ST_10004173	STM2983	2.24264			

106	ST_10003371	STM1970	2.241458			
107	ST_10005010	STM3970	2.232839			
108	ST_10005219	STM4256	2.23242			
109	ST_10003139	STM1706	2.230316			
110	ST_10004815	STM3733	2.228324			
111	ST_10003250	STM1828	2.212771			
112	ST_10003150	STM1717	2.207146			
113	ST_1000378	STM0521	2.205664			
114	ST_10002000	STM0286	2.202771			
115	ST_10000095	HCM2.0046c	2.199079			
116	ST_10003785	STM2454	2.193524			
117	ST_10000894	STM4041	2.192567			
118	ST_10003447	STM2067	2.19079			
119	ST_10001982	STM0259	2.186324			
120	ST_10005222	STM4259	2.182177			
121	ST_10004153	STM2961	2.178779			
122	ST_10003678	STM2333	2.178332			
123	ST_10003633	STM2287	2.16821			
124	ST_10004799	STM3716	2.167325			
125	ST_10003346	STM1939	2.165587			
126	ST_10004130	STM2930	2.163067			
127	ST_10004777	STM3693	2.154395			
128	ST_10005088	STM4062	2.153419			
129	ST_10004001	STM2782	2.152534			
130	ST_10004775	STM3691	2.149986			
131	ST_10004138	STM2946	2.134394			
132	ST_10005313	STM4364	2.126622			
133	ST_10000241	PSLT066	2.124578			

134	ST_10005304	STM4355.S	2.116931			
135	ST_10004269	STM3095	2.110427			
136	ST_10005241	STM4279	2.095876			
137	ST_10004446	STM3305	2.093652			
138	ST_10003930	STM2649	2.088635			
139	ST_10005207	STM4243	2.087327			
140	ST_10004527	STM3401	2.086946			
141	ST_10003145	STM1712	2.079573			
142	ST_10004804	STM3722	2.076191			
143	ST_10003160	STM1728	2.075759			
144	ST_10005490	STM0638	2.069953			
145	ST_10005226	STM4263	2.061243			
146	ST_10004687	STM3586.S	2.056797			
147	ST_10005210	STM4246	2.040503			
148	ST_10001316	STY3068	2.029319			
149	ST_10005229	STM4266	2.02342			
150	ST_10005181	STM4192	2.02033			
151	ST_10000003	HCM1.104c	2.019659			
152	ST_10003673	STM2328	2.016625			
153	ST_10005514	STY1853	2.011929			
154	ST_10003223	STM1801	2.005821			
155	ST_10003301	STM1890	2.004075			
156	ST_10002949	STM1475	2.003742			
157	ST_10005443	STM4551	2.001336			
158	ST_10004542	STM3417	2.00098			

Anexo 2

Tabla 4. Reguladores transcripcionales que se expresan diferencialmente en la cepa <i>S. Typhi</i> IMSS-1 Δ CRISPR-cas crecida en MM-N pH 7.5.			
Reguladores transcripcionales que disminuyen su expresión	Zscore	Reguladores transcripcionales que aumentan su expresión	Zscore
<i>STY1386</i>	-2.155134	<i>trpR</i>	3.083593
<i>fur</i>	-2.750404	<i>STY4468</i>	3.08738
<i>pefL</i>	-3.401512	<i>zur</i>	4.02294
<i>ydcN</i>	-4.536761	<i>lldR</i>	2.154395
		<i>eutR</i>	2.193524
		<i>rpoN</i>	3.606527
		<i>soxR</i>	2.02342
		<i>rstA</i>	2.003742
		<i>ssbB</i>	2.124578
		<i>basR</i>	2.124578
		<i>ydeW</i>	2.412748
		<i>pocR</i>	2.518505

Anexo 3

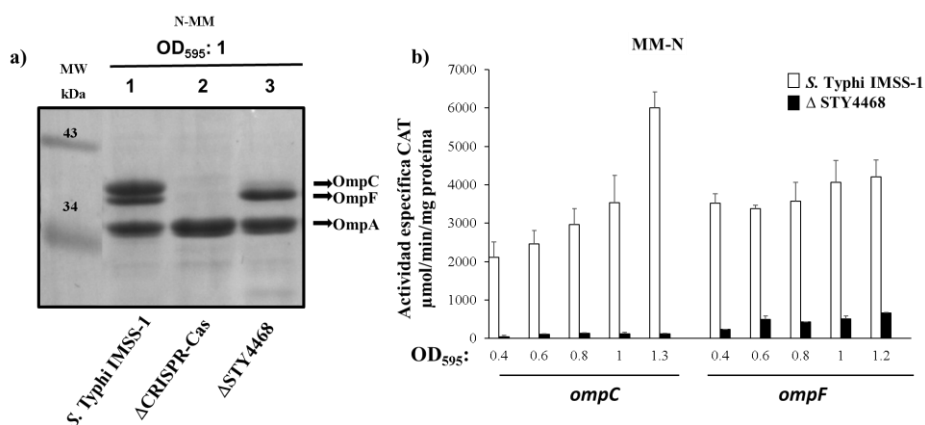


Figura 11. *STY4468* es necesario para la síntesis de OmpC en *S. Typhi* IMSS-1.

a) Perfil de proteínas de membrana externa (OMPs) de las cepas *S. Typhi* IMSS-1 (carril 1), *S. Typhi* IMSS-1 Δ CRISPR-cas (carril 2) y *S. Typhi* IMSS-1 Δ STY4468 (carril 3). Las flechas indican las tres OMPs más abundantes: OmpC, OmpF y OmpA. Se incluye el marcador de peso molecular (MW). Las proteínas fueron visualizadas utilizando azul de Coomassie. b) Perfil transcripcional de *S. Typhi* IMSS-1 y *S. Typhi* IMSS-1 Δ STY4468 que contienen los plásmidos pKK9/*ompC* 772+27 Y pKK8/*ompF* -782+184. Las actividades específicas de CAT se midieron a una OD_{595nm} de 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2. La desviación estándar son las medias de un experimento realizado por duplicado. Las cepas fueron crecidas en MM-N a OD_{595nm}: 1, pH 7.5.

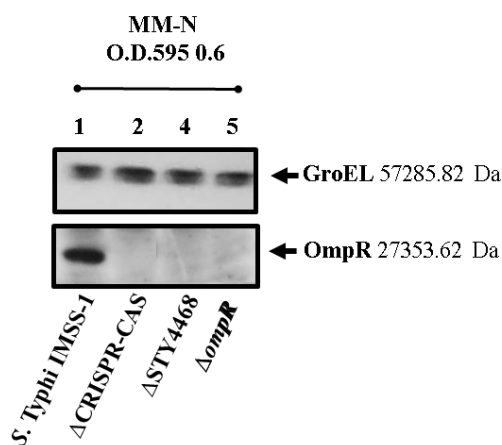


Figura 12. *STY4468* regula positivamente a OmpR en *S. Typhi* IMSS-1.

Western-Blot de OmpR en *S. Typhi* IMSS-1 (carril 1), *S. Typhi* IMSS-1 Δ CRISPR-cas (carril 2), *S. Typhi* IMSS-1 Δ STY4468 (carril 3) y *S. Typhi* IMSS-1 Δ ompR (carril 4) crecidas en MM-N a OD_{595nm} de 1.